



Estudo dos Genes Modificadores da Doença Poliquística Renal Associados à Doença Cardiovascular

Mestrado em Biologia Humana e Ambiente

Ana Carolina Casinhas dos Santos

Dissertação orientada por:

Professor Doutor Manuel Bicho (Faculdade de Medicina, Universidade de Lisboa);
Professora Doutora Deodália Dias (Faculdade de Ciências, Universidade de Lisboa)



Estudo dos Genes Modificadores da Doença Poliquística Renal Associados à Doença Cardiovascular

Mestrado em Biologia Humana e Ambiente

Ana Carolina Casinhas dos Santos

Dissertação orientada por:

Professor Doutor Manuel Bicho (Faculdade de Medicina, Universidade de Lisboa);
Professora Doutora Deodália Dias (Faculdade de Ciências, Universidade de Lisboa)

PUBLICAÇÕES

Resumo em revistas Nacionais com arbitragem científica

Matos A., Pereira da Silva A., Oliveira T., Casinhas AC, Afonso C., Luz-Rodrigues H, Neves F., Almeida E., Bicho M., “The Haptoglobin genetic polymorphism susceptibility and natural history of chronic kidney disease”, Revista Portuguesa de Hipertensão – Risco Cardiovascular; Número 48, Julho/Agosto, ISSN:1646-8287, 2015.

Congressos Nacionais

Matos A., Pereira da Silva A., Oliveira T., Casinhas AC, Afonso C., Luz-Rodrigues H, Neves F., Almeida E., Bicho M., “The Haptoglobin genetic polymorphism susceptibility and natural history of chronic kidney disease”, Congresso Português de Hipertensão e Risco Cardiovascular Global, 26 de Fevereiro a 31 de Março de 2015 (Oral).

“Every one of us was once a cyst- a blastocyst”

Jared J. Grantham

NOTAS PRÉVIAS

Esta tese de mestrado foi escrita de acordo com o formato de citação da revista *European Journal of Human Genetics*.

Ao meu avô

AGRADECIMENTOS

Este trabalho não teria sido finalizado sem a ajuda de várias pessoas. Em particular, eu gostaria de expressar a minha sincera gratidão:

Ao Professor Doutor Manuel Bicho por me ter aceite neste projecto e pelo seu conhecimento que se revelaram fundamentais para a conclusão deste trabalho.

À Professora Doutora Deodália Dias, por toda a simpatia demonstrada, pelo carinho, disponibilidade e consideração que tem pelos seus alunos.

Ao Professor Edgar Almeida, pelo apoio clínico, científico, disponibilidade, simpatia e por me entusiasmar por este projecto que se iniciou com a sua tese de Doutoramento.

À Doutora Helena Soares Costa, Investigadora Responsável do projecto intitulado “Hábitos alimentares, hiperhomocisteínemia e doença cardiovascular na Diabetes tipo 2” financiado pela Fundação para a Ciência e Tecnologia com a referência PIC/IC/82957/2007, por ter aceite colaborar no presente estudo. Assim como à Doutora Ana Valente por se ter demonstrado disponível para colaborar e a criar a ligação entre o Laboratório de Genética e o INSA.

Um obrigada à Dr^a Joana Ferreira e à Téc.^a Conceição Afonso pela prestação de ajuda sempre que necessária.

Não podia deixar de agradecer a todas as pessoas que, este ano estiveram sempre comigo no laboratório. À Ângela, à Joana e à Vanessa um muito obrigada por tudo aquilo que passamos, pelo companheirismos, pelos risos e pelas lágrimas, pelo apoio!

À Dr^a Andreia Matos, por nunca ter desistido de acreditar em mim e nas minhas capacidades e por toda a ajuda na realização da minha tese desde o 1^o dia. Estou-te grata por tudo o que me ensinas-te e por tudo aquilo em que me ajudaste!

Um obrigada especial aos meus pais e aos meus avós, que sem o vosso apoio e incentivo nada disto seria possível. Obrigada por tudo o que fizeram por mim!

Ainda um obrigada especial aos meus amigos por cuidarem de mim em todos os momentos e acreditarem sempre que iria ser capaz.

Obrigada a ti Pedro, pela paciência, compreensão e amor incondicional.

ABSTRACT

The autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD) is characterized by the growth of cysts in the kidneys, which can progress to end-stage renal disease (ESRD). The genes of *MTHFR*, the *CβS* and *GST* are involved in the homocysteine cycle, cardiovascular risk marker. *Hp*, is an acute phase protein, associated to innate immunity, with antioxidant and anti-inflammatory properties.

The purpose is to study the progression of ADPKD to ESRD taking into account the modulation of genetic polymorphisms of *MTHFR*, *CBS*, *Hp*, and *GSTT1* and *GSTM1* genotype-phenotype, biochemical relationship.

The sample consisted of 883 subjects (N = 150 ADPKD, N = 144 DMII, N = 95 DMII-DRC, N = 94 N = DRT and 495 controls). The progression of CKD was evaluated according to the Cockcroft-Gault equation or creatinine in the urine. Genetic polymorphisms were determined by PCR and PCR-RFP. The phenotype of *Hp* was determined by electrophoresis on polyacrylamide gel. Creatinine, iron and ferritin in plasma were determined by standard methods. The erythrocyte activities: transmembrane reductase (TMR), methemoglobin reductase and acid phosphatase (AP) were determined by spectrophotometry. Statistical analysis was performed using SPSS 21.0 program. Statistically significant values for $p < 0.05$.

The *GSTM1* null genotype was associated with risk for ADPKD compared to controls. The CT *MTHFR* genotype was protective for ADPKD and CKD. In rapid progressors, 2.1 *Hp* phenotype and genotype *GSTM1* null were protective and not null genotype was associated with risk.

In genotype-phenotype-biochemical relationship, AP was lower in DMII in relation to all groups; in ADPKD, the RTM was higher compared to ESRD or CKD-DMII.

The polymorphisms analyzed may influence the progression of ADPKD for CKD. The activity of erythrocyte enzymes seem to be related to the etiology of the disorders studied reflecting the variation of erythropoietin, homocysteine and increased hepcidin.

Keywords : Autosomal dominant polycystic kidney disease, Haptoglobin; Glutathione S-transferase; Methylenetetrahydrofolate reductase; Cystathionine β-synthase.

RESUMO

A doença poliquística renal autossómica dominante (DRPAD) é caracterizada pelo crescimento de quistos nos rins, podendo evoluir para doença renal terminal (DRT). Os genes da *MTHFR*, da *CβS* e da *GST* estão envolvidos no ciclo da homocisteína, marcador de risco cardiovascular. A *Hp*, uma proteína de fase aguda, está associada à imunidade inata, com propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias.

O objectivo é estudar a evolução DRPAD para DRT tendo em conta a modulação dos polimorfismos genéticos da *MTHFR*, *CBS*, *Hp*, *GSTT1* e *GSTM1* e a relação genótipo-fenótipo-bioquímico.

A amostra foi constituída por 883 indivíduos (N=150 DRPAD, N=144 DMII, N=95 DMII-DRC, N=94 DRT e N=495 controlos). A progressão na DRC foi avaliada segundo a equação de Cockcroft-Gault ou creatinina na urina. Os polimorfismos genéticos foram determinados por PCR e PCR-RFP. O fenótipo da *Hp* foi determinado por electroforese em gel de poliacrilamida. A creatinina, ferritina e ferro foram determinados no plasma por métodos padrão. As actividades do eritrócito: redutase transmembranar (RTM), redutase da metahemoglobina e fosfatase ácida (FA) foram determinados por espectrofotometria. A análise estatística foi realizada no programa SPSS 21.0. Valores estatisticamente significativos para $p<0.05$.

O genótipo nulo da *GSTM1* foi risco para a DPRAD comparativamente aos controlos. O genótipo CT da *MTHFR* foi de protecção para DPRAD e DRC. Nos progressores rápidos, o fenótipo *Hp* 2.1 e o genótipo nulo *GSTM1* foram protetores e o genótipo não nulo de risco. Na relação genótipo-fenótipo-bioquímico, a FA foi inferior na DMII em relação a todos os grupos; na DPRAD, a RTM esteve mais elevada em relação à DRT ou à DMII-DRC.

Os polimorfismos analisados poderão influenciar a progressão da DPRAD para a DRC. A actividade dos enzimas do eritrócito parecem estar relacionadas com a etiologia das patologias estudadas reflectindo a variação da eritropoetina, da homocisteína e aumento da hepcidina.

Palavras-chave: Doença poliquística renal autossómica dominante; Haptoglobina; Glutathione S-transferase; Metilenotetrahidrofolato redutase; Cistationina β-sintase.

ÍNDICE

ABSTRACT	I
RESUMO	II
1. INTRODUÇÃO	3
1.1. Fisiologia do Rim	3
1.1.1. Aparelho justaglomerular	7
1.2. Doença Poliquística Renal	7
1.3. Diagnóstico da Doença Poliquística Renal	9
1.4. PKD1 e PKD2	9
1.5. Cistogénese	11
1.6. Progressão da Doença Poliquística Renal para a Doença Renal Crónica	12
1.7. Hipertensão e Relação com Doença Poliquística Renal e Doença Renal Crónica	15
1.8. Influência das Doença Cardiovascular na Progressão para a Doença Renal Crónica	16
1.9. Diabetes <i>Mellitus</i> na Doença Renal Crónica	17
1.10. Metabolismo da Homocisteína	19
1.11. Genes modificadores	22
1.11.1. Haptoglobina	22
1.11.2. <i>Glutathione S-transferase</i>	24
1.11.3. <i>Metilenotetrahidrofolato redutase</i>	26
1.11.4. <i>Cistationina β-sintase</i>	29
2. OBJECTIVOS	35
3. MATERIAIS E MÉTODOS	39
3.1. Caracterização da Amostra Populacional	39
3.2. Função Renal	40
3.3. Medidas Antropométricas	40
3.4. Parâmetros Hemodinâmicos e Bioquímicos	40
3.5. Critérios de Inclusão	41
3.6. Colheita e Processamento de Sangue Periférico	41

3.6.1. Extração do ADN genómico	41
3.6.2. Quantificação do ADN	41
3.6.3. Redutase Transmembranar do eritrócito	42
3.6.4. Redutase da Metahemoglobina do eritrócito	42
3.6.5. Fosfatase Ácida do eritrócito	42
3.6.6. Fenótipo da Haptoglobina	42
3.7. Variantes Genéticas Analisadas	43
3.7.1. Determinação genética	43
3.7.2. Electroforese em gel de agarose	44
3.8. Análise Estatística	45
4. RESULTADOS	49
4.1. Caracterização da População	49
4.2. Genes Modificadores na Doença Poliquística Renal para Progressão para a Doença Renal Crónica	50
4.2.1. Haptoglobina	52
4.2.2. <i>GSTT1/M1</i>	54
4.2.3. <i>MTHFR</i> C677T (rs1801133)	58
4.2.4. <i>CβS</i> (SNP de inserção)	62
4.3. Fenótipo Intermédio	67
4.4. Relações Genótipo-fenótipo-bioquímico Envolvidos na Progressão para a Doença Renal Crónica	69
4.4.1. Haptoglobina	69
4.4.2. <i>GSTT1</i>	71
4.4.3. <i>GSTM1</i>	72
4.4.3. <i>MTHFR</i>	73
4.4.4. <i>CβS</i>	74
5. DISCUSSÃO	83
5.1. Fenótipo Intermédio	83
5.2. Genótipo-fenótipo-bioquímico Envolvidos na Progressão para a Doença Renal Crónica	85
5.2.1. Haptoglobina	85

5.2.2. Glutathione-S-Transferase T1/M1	92
5.2.3. Metileno-tetra-hidrofolato-reductase	94
5.2.4. Cistationa- β -Sintetase	95
6. CONCLUSÃO	99
7. REFERÊNCIAS	103
ANEXOS	125
Anexos 1- Consentimento informado	125
Anexos 2- Tabelas suplementares	126
Anexos 3- Visualização dos genótipos após electroforese	128

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1: PROGRESSÃO DA DOENÇA RENAL PELA ESTIMATIVA DA TAXA DE FILTRAÇÃO GLOMERULAR E ALBUMINÚRIA.	13
FIGURA 2: ESQUEMA DA VIA DO METABOLISMO DA HOMOCISTEÍNA.....	20
FIGURA 3: ELECTROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA QUE EVIDENCIA OS 3 FENÓTIPOS DA HAPTOGLOBINA.	43

ÍNDICE DE TABELAS

TABELA 1: POLIMORFISMOS GENÉTICOS ANALISADOS, LOCALIZAÇÃO NO CROMOSSOMA E RESPECTIVAS ALTERAÇÕES.	43
TABELA 2: CARACTERÍSTICAS SELECIONADAS DA AMOSTRA ESTUDADA.	49
TABELA 3: DISTRIBUIÇÃO DOS FENÓTIPOS DA <i>HP</i> E DOS GENÓTIPOS DA <i>GSTT1</i> , <i>GSTM1</i> , <i>MTHFR</i> E <i>CbS</i> EM CONTROLOS, EM INDIVÍDUOS COM DPRAD E COM DRT.	50
TABELA 4: DISTRIBUIÇÃO DOS FENÓTIPOS DA <i>HP</i> E DOS GENÓTIPOS DA <i>GSTT1</i> , <i>GSTM1</i> , <i>MTHFR</i> E <i>CbS</i> EM CONTROLOS, EM INDIVÍDUOS COM DMII, COM DMII-DRC E COM DRT.	51
TABELA 5: DISTRIBUIÇÃO DOS FENÓTIPOS DA HAPTOGLOBINA NOS GRUPOS: CONTROLOS, DPRAD, DMII (COM E SEM DRC) E DRT.	53
TABELA 6: DISTRIBUIÇÃO DOS GENÓTIPOS DO <i>GSTT1</i> NOS GRUPOS: CONTROLOS, DPRAD E DRT.	56
TABELA 7: DISTRIBUIÇÃO DOS GENÓTIPOS DA <i>GSTM1</i> NOS GRUPOS: CONTROLOS E DPRAD. ..	56
TABELA 8: DISTRIBUIÇÃO DOS GENÓTIPOS DA <i>GSTT1/M1</i> EM INDIVÍDUOS COM DPRAD COM E SEM HIPERTENSÃO ARTERIAL.	57
TABELA 9: DISTRIBUIÇÃO DOS GENÓTIPOS DA <i>MTHFR</i> NOS GRUPOS: CONTROLOS, DPRAD, DMII-DRC E DRT.	60
TABELA 10: DISTRIBUIÇÃO DOS GENÓTIPOS DA <i>MTHFR</i> NOS GRUPOS: DMII (COM E SEM DRC) E DRT.	60
TABELA 11: DISTRIBUIÇÃO DOS GENÓTIPOS DA <i>MTHFR</i> NOS GRUPOS: CONTROLOS, DPRAD COM DOENÇA RENAL CRÓNICA, DMII E DMII-DRC NOS ESTÁDIOS 4 E 5 DA DRC.	61
TABELA 12: DISTRIBUIÇÃO DOS GENÓTIPOS DA <i>CbS</i> NOS GRUPO: CONTROLOS, DPRAD, DMII (COM E SEM DRC) E DRT.	64
TABELA 13: DISTRIBUIÇÃO DOS GENÓTIPOS DA <i>CbS</i> NOS GRUPOS: CONTROLOS, DMII-DRC E DMII-DRC NOS ESTÁDIOS 4 E 5 DA DRC.	64

TABELA 14: DISTRIBUIÇÃO DOS FENÓTIPOS DA HAPTOGLOBINA E DOS GENÓTIPOS DA <i>GSTT1</i> , <i>GSTM1</i> , <i>MTHFR</i> E <i>CbS</i> EM INDIVÍDUOS COM DPRAD COM PROGRESSÃO LENTA OU RÁPIDA SEGUNDO A EQUAÇÃO DE COCKCROFT-GAULT E O DECLIVE DE CREATININA	66
TABELA 15: CARACTERÍSTICAS ANTROPOMÉTRICAS E BIOQUÍMICAS PARA OS GRUPOS DPRAD VERSUS DRT, DMII E DMII-DRC.....	68
TABELA 16.1: CARACTERÍSTICAS ANTROPOMÉTRICAS E PARÂMETROS BIOQUÍMICOS (CREATININA E COCKCROFT-GAULT) PARA OS GRUPOS DPRAD VERSUS DRT, DMII E DMII-DRC POR FENÓTIPOS DA <i>HP</i> E GENÓTIPOS DA <i>GSTT1</i>	76
TABELA 16.2: PARÂMETROS BIOQUÍMICOS (FERRITINA, FERRO, FA E RTM) PARA OS GRUPOS DPRAD VERSUS DRT, DMII E DMII-DRC POR FENÓTIPOS DA <i>HP</i> E GENÓTIPOS DA <i>GSTT1</i>	77
TABELA 17.1: CARACTERÍSTICAS ANTROPOMÉTRICAS E PARÂMETROS BIOQUÍMICOS (CREATININA E COCKCROFT-GAULT) PARA OS GRUPOS DPRAD VERSUS DRT, DMII E DMII-DRC POR GENÓTIPOS DA <i>MTHFR</i> E DA <i>GSTM1</i>	78
TABELA 17.2: PARÂMETROS BIOQUÍMICOS (FERRITINA, FERRO, FA E RTM) PARA OS GRUPOS DPRAD VERSUS DRT, DMII E DMII-DRC POR GENÓTIPOS DA <i>MTHFR</i> E DA <i>GSTM1</i>	79
TABELA 18: CARACTERÍSTICAS ANTROPOMÉTRICAS E PARÂMETROS BIOQUÍMICOS PARA OS GRUPOS DPRAD VERSUS DRT, DMII E DMII-DRC POR GENÓTIPOS DA <i>CbS</i>	80

ABREVIATURAS

ADMA	Dimetilarginina assimétrica
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AMPc	Adenosina 3',5'-monofosfato cíclico
ARN	Ácido ribonucleico
AVC	Acidente vascular cerebral
BRA	Bloqueadores dos receptores de angiotensina
CIM	Camada íntima-média
CKD-EPI	<i>Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration</i>
CRISP	<i>Consortium for Radiologic Imaging Studies in Polycystic Kidney Disease</i>
CV	Cardiovascular
C β S	Cistationina β -sintase
DAC	Doença arterial coronária
DCV	Doença cardiovascular
DE	Disfunção endotelial
DMII	Diabetes <i>mellitus</i> tipo II
DMII-DRC	Diabetes mellitus tipo II com doença renal crónica
DPR	Doença Poliquística renal
DPRAD	Doença poliquística renal autossómica dominante
DPRAR	Doença poliquística renal autossómica recessiva
DRC	Doença renal crónica
DRT	Doença renal terminal
ECA	Enzima conversora de agiotensina
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EPO	Eritropoetina
ERO	Espécies reactivas de oxigénio
FA	Fosfatase ácida eritrocitária
GSTM1	Glutathione S-transferases M1
GSTT1	Glutathione S-transferases T1
H ₂ S	Sulfureto de hidrogénio
Hb	Hemoglobina
Hc	Homocisteína
HHc	Hiperhomocisteinémia
HIF1- α	Factor 1 alfa induzível por hipóxia
HIFs	Formas induzível por hipóxia

ABREVIATURAS

<i>Hp</i>	Haptoglobina
HT	Hipertensão
HTA	Hipertensão arterial
HVE	Hipertrofia ventricular esquerda
HW	Equilíbrio de Hardy-Weinberg
IC	Intervalo de confiança
IMC	Índice de massa corporal
KDIGO	<i>Kidney Disease Improving Global Outcomes</i>
MDRD	<i>Modification of Diet in Renal Disease</i>
<i>MTHFR</i>	Metilenotetrahidrofolato redutase
NADH	Dinucleotídio reduzido da nicotinamida adenina
ND	Nefropatia diabética
NKF	<i>National Kidney Foundation</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
ON	Óxido nítrico
OR	<i>Odds ratio</i>
PA	Pressão arterial
PAD	Pressão arterial diastólica
PAS	Pressão arterial sistólica
pb	pares de bases
PC 1	Policistina 1
PC2	Policistina 2
PTH	Paratormona
RM	Ressonância magnética
RMHb	Redutase metahemoglobina
RPE	Células renais produtoras de eritropoetina
RTM	Redutase transmembranar
SAM	S-adenosilmetionina
SHARP	<i>Study of heart and renal protection</i>
SNS	Sistema nervoso simpático
S-RAA	Sistema renina-angiotensina-aldosterona
TAC	Tomografia axial computadorizada
TFG	Taxa de filtração glomerular
TSFR	Terapia substitutiva da função renal
VFC	Velocidade do fluxo coronário
VTR	Volume total do rim

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. Fisiologia do Rim

É um órgão par localizado na região retroperitoneal entre as vertebrae L1 e L4, apresentando em média 12 cm de comprimento e um peso de 150 g, dependendo do género e da fase de desenvolvimento ¹.

O rim apresenta uma zona cortical e medular. A primeira contém os glomérulos, túbulos contornados proximais e distais. Já a segunda é constituída pelas ansas de Henle e os túbulos colectores, os quais se alongam até às papilas dos pequenos cálices. Ainda é possível observar por exame macroscópico a presença do bacinete e do ureter. O rim é envolvido por uma membrana fibroelástica - cápsula renal - que adere ao bacinete e aos vasos na zona do hilo ².

No que diz respeito à circulação renal, o rim recebe aproximadamente 1L de sangue por minuto e 600 mL de plasma. Este sistema apresenta duas redes capilares em série, chamado sistema de porta arteriolar, no mesmo órgão – a rede capilar e a peritubular. A artéria renal (cujo o sangue é fornecido aos rins) divide-se em dois ramos: O anterior e o posterior. Em alguns casos é possível encontrar artérias secundárias, que se encontram geralmente no pólo inferior do rim devido à migração destes órgãos durante o desenvolvimento. Estes ramos dividem-se em várias artérias segmentares, que irão nutrir vários locais do rim. A drenagem do sangue é feita a partir da veia renal. 20% do plasma filtrado vai para a cápsula de Bowman, levando a uma taxa de filtração glomerular (TFG) em média de 120mL/min ¹.

Desta forma, o sistema de circulação define a composição da urina, influenciada pela TFG, as modificações nos capilares peritubulares no córtex entre outros factores que determinam a quantidade de água e solutos a ser excretados ⁴.

O nefrónio é a unidade funcional do rim que é constituído pelo glomérulo mais a cápsula de Bowman – corpúsculo renal – pelo túbulo contornado proximal e distal, ansas de Henle e túbulos colectores ¹.

O glomérulo (unidade de filtração do nefrónio, que é composto por uma rede de capilares com fornecimento vascular) é responsável também pela produção de um ultrafiltrado a partir do plasma. A barreira da filtração glomerular é formada por 3 camadas: endotélio, fenestrado, com aberturas irregulares do capilar glomerular; Membrana basal; Células

INTRODUÇÃO

epiteliais especializadas (podócitos) as quais rodeiam os capilares com as suas projecções citoplasmáticas, formando inúmeras fendas de filtração ².

O rim contribui de forma importante para o normal funcionamento das células através da manutenção do ambiente extracelular que lhes é essencial. Este é conseguido através da excreção de produtos finais do metabolismo que sejam hidrossolúveis, como a creatinina, a ureia e ácido úrico entre outros resíduos ⁴.

Outro papel fundamental é o balanço da excreção de água e eletrólitos (regulação de água e sal), bem como a regulação da pressão arterial sistémica e hemodinâmica renal através da produção de diversas hormonas tais como a renina, a angiotensina II, prostaglandinas e outros metabolitos como o óxido nítrico que regulam a actividade vascular e o fluxo renal ⁵. Para além destas hormonas existem outras produzidas também pelo rim que influenciam várias funções do órgão final. Como por exemplo, a secreção de eritrócitos que é estimulada pela síntese de eritropoetina (EPO) que é produzida no rim e no fígado de forma indutível através de hipoxia (HIFs) e activação de factores de transcrição de forma a manter a homeostase de oxigénio. Sob condições de hipoxia, a produção de EPO é aumentada e consequentemente o nº de células vermelhas aumenta também de forma a que o oxigénio chegue aos órgãos de forma eficiente ⁶.

Na DPRAD existe hipoxia em determinadas regiões como consequência do comprometimento de fluxo de sangue devido aos quistos. Desta forma é activado o factor de transcrição HIF1- α (principal transactivador para a expressão do gene da EPO), que é indutível pela hipoxia, sendo a DPRAD caracterizada por uma estabilização crónica do factor de transcrição ⁷.

Em condições de inflamação, as células renais produtoras de EPO (RPE) transformam-se em células microfibroblásticas, que estão associadas à fibrose renal. Desta forma, devido aos extensos danos renais, as RPE perdem a capacidade de produzir EPO, sendo frequentemente observado na anemia em pacientes com doença renal ⁶.

No rim é realizado o catabolismo de várias hormonas peptídicas, filtradas pelos glomérulos, como a insulina ⁸. Outro papel essencial do rim é o da regulação do metabolismo fosfocálcico uma vez que é no rim que ocorre a segunda hidroxilação da vitamina D que promove a absorção do cálcio intestinal e é no rim que a paratormona (PTH) mantém os níveis séricos de fosfato, aumentando a sua fracção de excreção quando este produto final do metabolismo é retido na insuficiência renal, gerando o hiperparatiroidismo secundário ⁴.

A monitorização da barreira de filtração glomerular dá-nos uma ideia da função renal do indivíduo. Esta permite a passagem selectiva de água e pequenos solutos hidrosolúveis. As cargas negativas do glicocálice do endotélio glomerular repelem pequenas moléculas de carga negativa mesmo com dimensão inferior ao dos póros da membrana de filtração, impedindo a sua filtração, como acontece com a albumina do sangue. A perda de selectividade de carga e tamanho resulta em proteinúria. Assim a filtração glomerular depende da permeabilidade do capilar glomerular e do equilíbrio entre o gradiente e pressão oncótica. A pressão arterial, o fluxo de plasma renal, o tonus aferente e eferente arteriolar e algumas hormonas e péptidos influenciam também a taxa de filtração glomerular (TFG). A pressão dos capilares glomerulares é uma força que aumenta a taxa, enquanto que um aumento da pressão oncótica faz o contrário ^{5,9,10}. Assim, a TFG é dada por:

$$TFG = (\text{porosidade capilar} \times \text{área de superfície}) \times \text{variação da pressão hidrostática} \\ - \text{a variação da pressão}$$

$$= (\text{porosidade capilar} \times \text{área de superfície}) \times (P_{CG} - P_{CB} - \pi_{CG}) \quad (1)$$

Sendo P_{CG} a pressão hidrostática no capilar glomerular, P_{CB} a pressão hidrostática na cápsula de Bowman e π_{CG} a pressão oncótica do plasma no capilar glomerular ⁴.

Desta forma, com base na fórmula (1), qualquer alteração em algum dos factores usados ou, por exemplo, na modificação do fluxo de plasmático renal, leva a alterações na TFG.

Esta taxa pode ser regulada através de substâncias neuro-hormonais tais como as do SNS (sistema nervoso simpático), o sistema renina-angiotensina-aldosterona (S-RAA), óxido nítrico (ON) e endotelina que influenciam a TFG em estados de doença, perturbando o volume intravascular, ou por autorregulação feita a partir da modulação dependente do tónus eferente e aferente arteriolar ^{1,5}.

Assim, é importante medir a TFG para melhor acompanhamento de doentes com doença renal, tais como a Doença Poliquística Renal (DRP) ou a Doença Renal Crónica (DRC). O marcador usado para medir as alterações da função renal deve ser apenas filtrado pelo glomérulo e preferencialmente não deve ser excretado após reabsorvido ou metabolizado pelo rim ¹.

A creatinina é o marcador mais usado uma vez que é produzido endogenamente a partir da creatina do músculo-esquelético e libertado no plasma a uma velocidade aproximadamente constante em indivíduos saudáveis ¹¹. No entanto, a creatinina é secretada activamente pelos tubos renais sendo uma desvantagem deste marcador subestimando a TFG em 10 a 20%. Deste modo a taxa através da qual a depuração da creatinina é calculada utilizando

INTRODUÇÃO

uma amostra de soro para a obtenção da concentração do marcador e uma amostra de urina de 24 horas para se obter o volume e a concentração de creatinina. Pode ser calculada através da seguinte expressão, sendo Cr_{Cl} a concentração de creatinina livre (volume de plasma depurado de creatinina por minuto), U_{Cr} e V a concentração e volume de creatinina na urina, respectivamente e S_{Cr} a concentração de creatinina no plasma⁴.

$$Cr_{Cl} = \frac{U_{Cr} \times V}{S_{Cr}} \quad (2)$$

Embora se possa utilizar o valor de creatinina livre no plasma, é mais útil quando utilizamos uma “representação gráfica” como $\frac{1}{S_{Cr}}$ para verificar a alteração da TFG ao longo do tempo. Portanto, formulas como a de Cockcroft-Gault e a MDRD (*Modification of Diet in Renal Disease*) são mais precisas e aceites cientificamente. Estas utilizam dados como por exemplo, a idade, o género ou a grupo étnico em conjunto com a concentração de creatinina no plasma. Desde modo a equação de Cockcroft-Gault é dada por^{12,13}.

$$\frac{140 - Idade (anos) \times Peso (Kg)}{72 \times S_{Cr} (mg/dL)} \quad (3)$$

Tendo de se multiplicar por 0.85 no caso de ser do sexo feminino. No entanto, a expressão de MDRD é mais precisa. Existem 2 fórmulas, uma em que é necessário BUN (azoto derivado de ureia) e a concentração de albumina (fórmula 4) e outra que é mais simplificada que apenas é necessário a concentração de creatinina no soro (fórmula 5)¹⁶.

$$170 \times [S_{Cr} (mg/dL)]^{-0.999} \times [Idade (anos)]^{-0.176} \times [0.762 (se for mulher)] \times [1.18 se for de raça negra] \times [BUN (mg/dL)]^{-0.170} \times [albumina (mg/dL)]^{0.318} \quad (4)$$

$$186 \times [S_{Cr} (mg/dL)]^{-1.154} \times [Idade (anos)]^{-0.203} \times [0.742 (se for mulher)] \times [1.21 se for de raça negra] \quad (5)$$

No entanto, recentemente surgiu uma nova fórmula (fórmula 6), CKD-EPI (Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration). Tal como a MDRD, CKD-EPI utiliza a idade, sexo e etnia, sendo mais adequada para calcular os estádios mais iniciais da DRC. Actualmente, CKD-EPI em conjunto com a MDRD são as equações para a TFG estimada mais correctas do ponto de vista científico¹⁵.

$$TFG = 141 \times \min(Cr_s / \kappa, 1)^\alpha \times \max(Cr_s / \kappa, 1)^{-1.209} \times 0.993^{Age} \times 1.018 [se mulher] \times 1.159 [se raça negra] \quad (6)$$

Sendo Cr_s creatinina no soro em mg/Dl, k é 0.7 se for mulher ou 0.9 se for homem, α é - 0.329 se for mulher e -0.411 se for homem, min indica o mínimo de Cr_s/k ou 1 e max indica máximo de Cr_s/k ou 1 ¹⁵.

1.1.1. Aparelho justaglomerular

Situado junto ao glomérulo, o aparelho justaglomerular é constituído por:

- Arteríola eferente e aferente;
- Mácula densa;
- Região mesangial extraglomerular.

Esta é a estrutura com maior relevância no sistema RAA, uma vez que participa no mecanismo de feedback entre o túbulo distal e as arteríolas aferentes e eferentes. Este sistema tem como função regular o metabolismo de sódio, pela teoria do receptor de volume (em que a alteração do volume das arteríolas será responsável pela libertação de renina), havendo um aumento do volume arteriolar, existe também um aumento do contacto com o túbulo distal e menos libertação de renina ⁵.

Este péptido pode exercer funções vasoconstritoras, quando libertada da superfície glomerular filtrante, causando assim uma consequente redução do filtrado glomerular, levando muitas vezes a um quadro de hipertensão arterial (HTA) sistémica de causa renovascular numa fase mais inicial ¹⁰. Uma vez que existe uma hiperactividade do sistema Renina-Angiotensina, a excreção de sódio é detectada por receptores do aparelho justaglomerular e da mácula densa, o que leva a um excesso de libertação de angiotensina do lado do rim estenótico ⁵.

A retenção do sódio é realizada pela aldosterona, sendo por isso a regulação de microcirculação renal efectuada pela angiotensina II ¹.

1.2. Doença Poliquística Renal

A doença Poliquística renal é herdada de forma autossómica dominante (DPRAD) ou recessiva (DPRAR). Apesar de terem padrões de hereditariedade e descrições clínicas distintas a nível molecular existem algumas semelhanças, visto que, ambas podem ser recessivas, com duas mutações na linha germinal na DPRAR e uma mutação germinal e outra somática no caso da forma dominante da doença ¹⁶.

INTRODUÇÃO

Na doença herdada de forma recessiva, os quistos derivam dos ductos colectores, já a forma dominante, pensa-se que podem ocorrer em qualquer nefrónio ou ducto colector ¹⁷. Estas diferenças podem ser observadas através de diagnóstico de imagem ¹⁸.

A DPRAD é caracterizada por quistos renais bilaterais preenchidos com fluído que vão aumentando progressivamente o teu tamanho, assim como o do rim, deformando-o ¹⁹ e levando à destruição do parênquima funcional ²⁰, ocorrendo em muitos casos o declínio da função renal e, muito vezes, levando à insuficiência renal crónica ²¹⁻²³.

No entanto, apesar do desenvolvimento dos quistos nos rins, existem alguns marcadores que podem ser detectados numa fase mais precoce da doença, antes mesmo de ocorrer um declínio da TFG, demonstrando que o parênquima renal se encontra sob stress, como é o caso da hiperfiltração, a perda da capacidade de concentração da urina, ligeira albuminúria e hematuria ^{24,25} e da hipertensão arterial (HTA) ²⁶.

A DPRAD é uma doença sistémica com manifestações extra-renais como a presença de quistos noutros locais (fígado, pâncreas, vesículas seminais e membrana aracnoide), aneurismas intracranianos, eventos cardíacos e vasculares (dilatação da raiz da aorta, disseção da aorta torácica, prolapso da válvula mitral e insuficiência aórtica) ^{18,19,27}, dores abdominais, infecções dos quistos e episódios de hemorragias, hérnias, litíase renal e hematuria ²⁸⁻³⁰. Assim, a HTA, a hematuria, a cólica renal e nefrolitíase são imagens de marca da DPRAD em adultos e podem ser usados como marcador para a doença renal e cardiovascular ^{22,26,30}.

As principais causas de morte hoje em dia são as doenças cardiovasculares, 92% morreram doentes com hipertrofia cardíaca acompanhada de aterosclerose (85%), estando a HTA associada a estas doenças e piorando o prognóstico de progressão ^{19,32}.

A DPRAD é considerada a nefropatia hereditária mais comum, ocorrendo em todas as raças como uma incidência de 1:400 a 1:1000 nos EUA ³³ e de 1:500 a 1:2500 nos países ocidentais ²². A seguir à HTA, à diabetes e as glomerulonefrites é a quarta causa de insuficiência renal crónica, tendo aproximadamente 5% de todos os casos ³⁴.

Em Portugal a prevalência da DPRAD apresentam taxas diferentes consoante a região em causa. Existirão entre 2700 e 4200 indivíduos portadores do gene da doença ³⁵.

Com base nos mecanismos subjacentes da cistogénese, várias vias foram estudadas para se descobrir uma terapêutica para a DPRAD. Essas vias incluem mediadores da proliferação celular (sarcoma, mTOR, MAPK 5-7), reguladoras do cálcio intracelular ³⁶ e reguladores de AMPc ³⁷. As terapêuticas para a redução da HTA, que inibem o S-RAA,

reduzem também a proteinúria e ajudam a uma progressão mais lenta, tanto em doentes diabéticos como em não diabéticos. Os inibidores da enzima conversora de angiotensina (ECA) e bloqueadores dos receptores de angiotensina (BRA) são os que oferecem maior renoproteção em pacientes com DRC ³⁸.

1.3. Diagnóstico da Doença Poliquística Renal

O meio de diagnóstico que é mais frequentemente utilizado é a ecografia, uma vez que é uma técnica mais barata e que está amplamente disponível. ³⁹, no entanto a tomografia axial computadorizada (TAC) e a ressonância magnética (RM) são métodos mais caros mas dispõem de uma maior sensibilidade ^{27,28}. A triagem pré-sintomática em crianças não é aconselhável, já nos adultos que têm historial familiar os benefícios superam os riscos e o diagnóstico é realizado ²⁷. Apesar do diagnóstico ser feito a famílias em risco pelos meios acima descritos, existem famílias atingidas (10%), sem historial familiar prévio que são acidentalmente descobertas a quando da realização desses mesmos exames ⁴⁰. O diagnóstico de imagem renal é também importante uma vez que nos permite analisar outras características relevantes na progressão da doença como é o caso do volume total do rim (VTR) e dos quistos ⁴¹.

As ecografias são muitas vezes insuficientes para determinar se um indivíduo com quistos simples e com idade inferior a 40 anos, e nestes casos muitas vezes é necessário realizar uma RM ⁴² ou um diagnóstico molecular, no caso de o indivíduo ser de uma família afectada e os diagnósticos de imagem serem ambíguos ⁴³.

Actualmente é usada a sequenciação directa a partir de ADN genómico, apesar de diversos estudos evidenciarem a grande heterogeneidade em PKD1 e PKD2, sendo que aproximadamente 2 % das famílias afectadas não têm mutações nestes genes. Todavia, na maioria das famílias com a doença, a mutação existe e é causadora da doença. De notar que existe uma ampla gama de mutações que causam a DPRAD, mas que qualquer mutação que causa a inactivação de um dos 2 genes é potencialmente patogénica ¹⁶.

1.4. PKD1 e PKD2

A DRPAD é na esmagadora maioria dos indivíduos causada por mutações nos genes PKD1 ou PKD2, que codificam a policistina 1 (PC1) e policistina 2 (PC2), respectivamente. Estas proteínas são glicoproteínas de membrana que são amplamente expressas em células epiteliais, do músculo liso vascular, miócitos cardíacos entre outros locais ^{28,44}. A PC1

INTRODUÇÃO

funciona como receptor e transdutor de sinal, comunicando informações para dentro da célula, interagindo com a PC2. O produto do gene da PKD2 é um canal de catiões não selectivo altamente permeável ao cálcio e que estão principalmente localizados no retículo endoplasmático ³⁴.

85% dos indivíduos que têm DPRAD apresentam mutações em PKD1 que se encontra no cromossoma 16 (16p13.3) e 15% apresentam mutações em PKD2 (4q22.1)⁴⁵. Aproximadamente 10% das pessoas com DPRAD não têm historial da doença, nestes casos, a doença pode ser mais leve ou mais grave, devido à penetrância incompleta, a mutação de novo (modificador) variantes do gene ou as influências do ambiente ⁴⁶.

Diversos estudos têm demonstrado que pacientes com mutações no PKD1 têm, geralmente, uma forma mais graves de DPRAD do que os pacientes com PKD2, com uma idade mais jovem no momento do diagnóstico, com um maior número de quistos, um início mais precoce da hipertensão, e um prognóstico mais rápido para a insuficiência renal crónica ^{28,38}.

No que diz respeito ao tipo de mutações dentro de cada gene, a grande maioria apresenta mutações com proteínas truncadas (70%), outros têm mutações missense (25%), e por último alguns pacientes possuem pequenas deleções in-frame ou mutações de splicing atípico ³⁸. As mutações não truncadas são consideradas hipomórficas uma vez que retêm resíduos funcionais e desta forma, diminuem a actividade de PC1, podendo ser esta uma das hipóteses para as diferentes formas da doença ^{30,38}, mas resultam em doença bastante grave em indivíduos homozigóticos ou quando ocorre juntamente com uma mutação truncada no segundo alelo ⁴⁴. Estudos recentes mostram um efeito alélico em PKD1 mais brando quando a mutação é não truncada ⁴⁷.

Apesar de existirem pacientes que não estão associados a nenhuma das mutações não existem certezas sobre a presença de um 3º gene envolvido. Apesar de uma reavaliação a família que não apresentavam qualquer ligação aos genes PKD1 e PKD2, mostraram ligação nesta nova avaliação a algum dos genes ⁴⁸.

Vários estudos abordam também o gene network como outra possibilidade para as diferenças fenotípicas da doença. Interações entre dois ou mais genes que envolvem gene networks foram mostradas como tendo impacto na dosagem de genes em PKD1 e na formação de quistos ²⁸.

Hoje em dia, pensa-se que também as vias metabólicas possam estar envolvidas para além da idade, da sensibilidade à inactivação de PKD1 ⁴⁵.

1.5. Cistogénese

Os quistos renais desenvolvem-se em associação com o espessamento da membrana basal dos túbulos e aumento da inflamação intersticial e fibrose que provocam cicatrizes na arquitectura renal ²⁹. Na DPRAD os quistos desenvolvem-se apenas numa minoria dos nefrónios⁴.

Os mecanismos celulares e moleculares que levam à formação de quistos, ao seu desenvolvimento e consequentemente, em alguns casos à progressão para a insuficiência renal crónica ainda levantam dúvidas⁴⁵.

Os quistos são formados no túbulo renal, quando existe a expansão radial provocada por uma proliferação celular epitelial de modo a formar uma saliência para fora do segmento tubular, resultado de uma conversão fenotípica de uma célula epitelial, apesar de no interior do quisto as células gerarem proteínas que mantêm as características moleculares e funcionais de segmentos tubulares diferenciados ²⁹.

Devido à libertação de marcadores de proliferação, proteínas da matriz e factores angiogénicos por parte do epitélio como é o caso das citocinas, quimiocinas, colagénio, numa tentativa de reparação da lesão, estas promovem a inflamação e fibrose no interstício adjacente ⁴⁹. A dilatação dos túbulos continua devido ao aumento da proliferação das células e da secreção de fluidos ²³.

Este processo de crescimento dos quistos repete-se vezes indefinidas e leva à destruição do parênquima renal e a uma diminuição da TFG. Os nefrónios onde não existem quistos vão desaparecendo por apoptose e vão ficando apenas os quistos que se encontram revestidos por espessas camadas fibrosas ⁵⁰. Os quistos podem ser encontrados tanto na medula como no córtex do rim, embora devido à localização e aos seus efeitos de obstrução os quistos medulares possam ter um efeito globalmente mais grave do que os corticais ^{23,29}. Consequentemente os efeitos sobre o fluxo sanguíneo renal e a formação de urina é amplificada também quando existe um maior número e tamanho ⁵¹.

O fluido que se acumula dentro dos quistos pode ser proveniente de 2 fontes: do filtrado glomerular não absorvido e do soluto trans-epitelial e secreção de fluidos ²⁹. Quando o quisto permanece ligado ao túbulo, existirá um grande fluxo de filtrado glomerular não absorvido que entrará no quisto e os níveis de secreção serão mais baixos ²³. Contudo, a maioria dos quistos separam-se dos túbulos que lhes deram origem e o mecanismo que permite que a adição do fluido e solutos ao lúmen é através de secreção de cloreto por transporte difuso de forma isosmótica ⁵². Assim, como as taxas de secreção de cloreto para os quistos

INTRODUÇÃO

isolado é maior que a taxa de absorção de solutos, o fluido vai-se acumulando e o quisto vai crescendo progressivamente ²⁹.

Para além do tamanho e abundância de quistos no rim, num estágio final da doença, existem grandes quantidades de bandas fibróticas densas de colagénio e de outras componentes da matriz celular, que vão delineando os quistos ¹. Assim, as arteríolas renais apresentam um espessamento, a musculatura lisa e global uma hipertrofia e assim, o tecido activa a produção local de angiotensina II, contribuindo ainda mais para lesões que comprometem a integridade e viabilidade da função renal ²³.

Estudos mostram de forma clara que apenas a presença de mutações em ambos os alelos das células tubulares não garantem a evolução do quisto, colocando em causa que é necessário um outro factor para iniciar o processo ²⁹.

O modelo mais aceite para a formação de quistos na DPR é o da teoria dos 2 eventos. Os indivíduos que são heterozigóticos e têm um alelo com mutação germinativa em PKD1 ou PKD2 e outro alelo normal (1evento), juntamente com uma segunda mutação somática numa cópia normal do gene (2 evento), afectando numa minoria das células, levam a que a expressão de PC1 e PC2 seja reduzida ou mesmo ausente, afectando a adesão célula-célula, a polaridade das membranas epiteliais, promoção de quistos funcionais e de defeitos no desenvolvimento de células epiteliais tubulares⁵³. Isto porque mutações homozigóticas são previstas como letais embrionariamente ^{38,45}.

Outro mecanismo importante e que também tem vindo a ser discutido é a possibilidade da existência de um 3º evento que pode ser também responsável pela variabilidade da taxa de desenvolvimento de quistos. O 3º evento poderá ser resultado de uma lesão renal isquémica, que promova a proliferação de células epiteliais dos túbulos e que induza a formação de quistos rapidamente, sendo as hormonas miogénicas neste caso a candidatas para o 2º eventos necessário para a DPRAD ²⁹.

1.6. Progressão da Doença Poliquística Renal para a Doença Renal Crónica

Actualmente não existe tratamento que preserve o parênquima renal, que em indivíduos com DPR se vai deteriorando, no entanto a TFG pode aparentemente parecer normal por várias décadas, o que demonstra que ela nem sempre é um bom marcador.

A insuficiência renal em indivíduos com DPRAD é principalmente consequência da formação e da expansão dos quistos que atrasa e bloqueia o fluxo de urina nos túbulos que não têm quistos e danifica a vasculatura na medula e no córtex levando à inflamação e fibrose intersticial secundária ²⁹.

O percurso dos indivíduos portadores da doença é muito heterogéneo, consoante diferentes factores, como a mutação que apresenta, a idade a que começam a ser detectados os primeiros quistos, a idade de início de hipertensão, o volume total do rim em relação ao esperado para a idade, complicações cardiovasculares e doenças como a diabetes *mellitus*⁴⁴.

A doença renal crónica é classificada quando existe lesões renais, que são definidas como anomalias estruturais ou funcionais do rim que persistem por mais de 3 meses. Estas manifestações incluem patologias ou anomalias que podem ser detectadas por exames imagiológicos, sangue ou urina. Consoante a TFG e recentemente com a albumina, criou-se uma classificação (Figura 1)³⁴.

Progressão da Doença Renal Crónica de acordo com a estimativa da taxa de filtração glomerular e albumina: KDIGO 2012				Categorias por albumina, descrição e intervalos		
				A1	A2	A3
				Normal ou diminuição ligeira	Diminuição moderada	Diminuição severa
				< 30 mg/g	30-299 mg/g	≥ 300 mg/g
Categoria por estimativa da TFG, descrição e intervalo (mL/min/1.73 m ²)	G1	Normal ou elevado	>90			
	G2	Ligeiramente diminuída	60-89			
	G3a	Ligeiramente-moderada diminuída	45-59			
	G3b	Moderada-severa diminuída	30-44			
	G4	Severamente diminuída	15-29			
	G5	Falha renal	< 15			

Figura 1: Progressão da doença renal pela estimativa da taxa de filtração glomerular e albuminúria. KDIGO, Kidney Disease Improving Global Outcomes. As cores representam o risco relativo ajustado para 5 eventos (mortalidade, diálise ou transplantação, doença renal aguda e progressão da doença renal). Verde corresponde aos de baixo risco, seguido do amarelo que corresponde aos de risco moderado, o laranja de risco elevado e o vermelho de muito elevado risco. Adaptado de Martínez-Castelao et al., 2014¹³.

Blanchette e Roy compararam a progressão para a doença renal terminal (DRT) numa população de indivíduos com DPRAD, com uma população de diversas doenças que também estavam a progredir para a DRT. Observaram que os indivíduos com DPRAD eram mais jovens e tinham comorbilidades muito específicas e características desta doença como é o caso de infecções do tracto urinário, cálculos nos rins, dor nos rins, abdominais e nos flancos. Mas mais interessante foi constatarem que indivíduos com DPRAD estavam mais tempo nos estádios mais leve antes de transitarem para estádios mais severos comparando com outros pacientes com DRC²⁶.

Com base na literatura, os pacientes com DPRAD com maior potencial para progressão rápida são os que têm hipertensão e hematuria antes do 30 anos, manifestações urológicas,

INTRODUÇÃO

quistos hepáticos, albuminúria a qualquer momento e que por volta da terceira década de vida já se encontre no estadio II da DRC ou com 50 anos e já no estadio III e aos 55 anos já se encontrar no estadio IV/V ou e terapia substitutiva da função renal (TSFR) ^{26,29,31}. Ainda factores demográficos como o género e o grupo étnico. No que diz respeito aos factores genéticos, o tipo de mutação que provoca a doença que o indivíduo apresenta interfere também no tipo de progressão, como já foi referido anteriormente ²³ sendo este considerado o factor mais forte para a progressão rápida ²².

Vários estudos revelam que a doença é mais grave no sexo masculino que têm um início mais precoce de HTA e da DRT ⁵⁴⁻⁵⁶, consistente com resultados do estudo CRISP (*Consortium for Radiologic Imaging Studies in Polycystic Kidney Disease*). No entanto, como em nenhum destes estudos foram feitos com uma base populacional, o efeito do género continua ainda por esclarecer ⁴⁴. Almeida et al. também não conseguiram provar um efeito do género na progressão da DPRAD ⁵⁷.

A quantidade de proteinúria e microalbuminúria correlacionam-se com o risco de progressão na DPRAD. No estudo MDRD, os níveis mais elevados de proteinúria foram associados a um declínio mais acentuado da TFG ⁵⁸. Noutro estudo com doentes com DPRAD, os que apresentavam valores de proteinúria mais elevados (18%) foram os que tiveram pior função renal, maior valor de pressão arterial (PA), e maior volume renal ²⁵. Pensa-se que a presença de proteinúria é também um factor para o aumento dos danos renal, uma vez que, as proteínas presentes na urina são tóxicas para os túbulos renais e podem levar à sua lesão, inflamação e formação de cicatrizes ¹.

As condições que induzem selectividade relativa à albumina raramente induzem lesão tubulointersticial significativa ⁵⁹. Geralmente a albumina actua como um antioxidante, no entanto pode transportar substâncias como lipopolissacáridos, ácidos gordos livres, prostaglandinas, metais pesados entre outros. A lesão oxidante pode ocorrer secundariamente à reabsorção aumentada do complexo de ferro e transferrina, com a dissociação intracelular e o aumento da actividade da produção de radicais livres ⁶⁰. Assim, a microalbuminúria não é necessariamente um marcador da doença renal, assim como o baixo grau de albuminúria é mais provável que seja um biomarcador da disfunção endotelial que um indicador para a doença renal ³⁴.

O stresse oxidante pode promover lesões renais, através das alterações da biodisponibilidade do óxido nítrico (ON) ao nível do rim. Estudos em animais sugerem que o desequilíbrio oxidante-antioxidante agrava o declínio da função renal em animais com DPRAD de rápida progressão ⁶¹. Contudo, a questão de se saber se o aumento do stress oxidante ocorre numa fase inicial da DPRAD e em que medidas uma redução da protecção

anti-oxidante está implicada na patologia da disfunção endotelial permanece desconhecida⁶².

Em suma, a DCR ocorre devia as lesões nos nefrónios provocadas por diversos efeitos que podem levar a que a progressão na doença seja mais ou menos rápida. A hipertensão, a hiperfiltração, a hiperglicemia, altos níveis de proteinúria e albuminúria e uma exacerbação do S-RAA são os principais factores para um declínio mais rápido até ao estadio 5 da DRC.

1.7. Hipertensão e Relação com Doença Poliquística Renal e Doença Renal Crónica

Os pacientes com DPRAD têm o risco aumentado para doenças cardiovascular e hipertensão quando comparados com a população normal^{28,34}. As normas orientadoras da KDIGO 2012 sugerem uma pressão arterial inferior a 140/90 mmHg²⁸. O controlo da pressão arterial pode ser conseguido recorrendo a alterações no estilo de vida ou a medicação. Estando o S-RAA relacionado com o aumento da pressão arterial devido à compressão nos quistos dos vasos, os agentes que interferem neste sistema são os agentes de primeira linha para reduzir a pressão arterial em combinação com a redução de sódio na dieta⁵³, este tipo de agentes também foi associado em ensaios de MDRD a uma taxa de filtrado glomerular anular mais baixo. Já no que diz respeito ao agente de segunda linha, estudos com populações não DPRAD indicam que os bloqueadores dos canais de cálcio e diuréticos são de preferencia aos beta-bloqueadores para protecção cardiovascular²⁸.

A HTA ocorre em mais de 60% dos indivíduos com DPRAD e ocorre antes da perda da função renal, e sobe para os 100% em pacientes com insuficiência renal crónica.²³ Ocorre e afecta mais cedo e de uma forma mais comum os indivíduos com PKD1. A história familiar para a hipertensão é também um factor de risco, uma vez que indivíduos com antecedentes têm de forma geral um começo mais precoce da hipertensão, em média 30 a 34 anos e afectando mais os homens⁶³. Esse início precoce da hipertensão está associado com uma progressão mais rápida e com um aumento da probabilidade de vir a progredir até ao estadio 5 da doença renal crónica (Doença renal terminal)¹⁹. Almeida et al. verificaram que mesmo em jovens indivíduos normotensos diagnosticados com DPRAD em ambulatório as suas pressões arteriais eram significativamente mais elevadas do que a população controlo ajustada para o sexo e a idade²².

Desta forma, a presença de quistos tem sido associada ao princípio do desenvolvimento da hipertensão com o envolvimento da activação do S-RAA intra-renal, principalmente em murganhos PKD1⁶⁴. Existem várias provas que suportam esta teoria, como o facto de a

INTRODUÇÃO

renina, angiotensinogénio (AGT) e a angiotensina II (angII) estarem presentes em grandes quantidades no fluido renal e nos túbulos dilatados ⁶⁵.

Ainda assim, existem outras teorias para o desenvolvimento da HTA elevada na DPRAD, particularmente nas fases iniciais da doença, para além da activação do S-RAA por parte de uma lesão isquémica intra-renal nos rins poliquísticos ³⁴, como é o caso da evidência de que disfunções cardiovasculares poderem estar relacionadas com uma função ciliar anormal, conduzindo à hipertensão ²¹.

Mais recentemente, através do estudo de imagens do Consortium for Radiologic Imaging Studies in Polycystic Kidney Disease (CRISP) observou-se que a redução de fluxo sanguíneo da artéria renal é prévia ao declínio da TFG e está inversamente correlacionado com o volume do rim, propondo uma relação de causa-efeito entre a isquémia intra-renal secundária, a expansão de quistos e o desenvolvimento da hipertensão ⁶⁶.

A hipertensão arterial é um factor importante para a mortalidade e morbilidade cardiovasculares de doenças com DPRAD ²³. No entanto, o seu controlo leva a uma taxa de eventos cardiovasculares extremamente baixa ²².

1.8. Influência das Doença Cardiovascular na Progressão para a Doença Renal Crónica

A doença cardiovascular (DCV) é a principal causa de morte em doentes com DRC e com DPRAD ⁶⁷. Os factores tradicionais que aumentam o risco de DCV em indivíduos com DRC são a hipertensão, a hiperlipidemia, a diabetes *mellitus*, o uso de tabaco e o sedentarismo. Existem ainda factores modificados pela DCR como é o caso da anemia, hiperparatireoidismo, desnutrição e stresse oxidante ³⁸.

A HTA, a disfunção endotelial (DE), o aumento da espessura da camada íntima-média (CIM), a hipertrofia ventricular esquerda (HVE) e a velocidade do fluxo coronário (VFC) foram consideradas como factores de riscos cardiovascular (CV) mais frequentes em indivíduos com DPRAD com função renal conservada ^{68,69}.

A presença de aterosclerose e inflamação têm sido encontrada em pacientes com DPRAD nas primeiras décadas de vida e tem sido sugerido que contribuem para o aumento do risco de DCV ⁶⁸.

Perturbações nas concentrações de cálcio intracelular contribuem de forma importante para a insuficiência cardíaca, devido à contratilidade ficar prejudicada. Este défice na

homeostasia tem sido implicada também no desenvolvimento da HVE ⁶⁹. Pietrzak-Nowacka et al. descobriram que pacientes com DPRAD com função renal normal apresentavam maior concentração de cálcio no soro e nos eritrócitos em comparação com os controlos sem DPRAD. Estes dados podem evidenciar que o percurso normal da DPRAD leva a uma perturbação das concentrações de cálcio que precedem a DRT ⁷⁰.

A DE é comum e ocorre precocemente em indivíduos com DPRAD. Num estudo realizado, pacientes com rins poliquísticos, com e sem HTA tinha maior disfunção endotelial (medida com base na dilatação dependente do endotélio da artéria braquial) do que indivíduos saudáveis com ou sem hipertensão, respectivamente ⁷¹. O endotélio do quisto em pacientes com DPRAD exibe um aumento da expressão de endotelina 1 em comparação com pacientes saudáveis ou com HTA, péptido que também é encontrada no fluido do quisto. Além de mais, o relaxamento dependente do endotélio é prejudicado na actividade de síntese do ON é diminuída em pacientes com DPRAD ⁶³. Desta forma, a libertação de ON é mínima e forma-se um desequilíbrio entre endotelina e ON que contribui para a hipertensão em doentes com DPRAD ⁶³.

Wang et al. descobriram que pacientes com DPRAD tinham um aumento significativo de dimetilarginina assimétrica (ADMA, marcador de inibição do ON e do produto de excreção da peroxidação lipídica do ácido 13-hidroxiocetadecadienoico) no plasma e ácido 13-hidroxiocetadecadienoico também no plasma e uma diminuição significativa da eliminação de ADMA na urina, comparando com controlos saudáveis ⁷².

A inflamação sistémica é considerada como uma potencial via de desregulação subjacentes e associadas à DRC e à DE. Pacientes com DRC parecem ser propensos a desenvolver um estado de microinflamação persistente, devido ao aumento da produção, bem como à redução da depuração renal de citocinas pró-inflamatórias ⁶⁸.

Em suma, o stress oxidante pode promover lesões renais através de inúmeros mecanismos. Quando não existe o equilíbrio entre oxidante-antioxidante, esse declínio agrava a função renal e a progressão em doentes com DPRAD é mais rápida ⁶².

1.9. Diabetes *Mellitus* na Doença Renal Crónica

A nefropatia diabética (ND) é a causa mais comum de DRT e ocorre em mais de 40% dos doentes em diálise ⁷³.

INTRODUÇÃO

A doença está associada a um stress oxidativo e a um estado pró-inflamatório ⁷⁴. Os níveis no soro de folato, vitamina B12, B6, de Hc, cistationina estão associados com o grau da doença renal na nefropatia diabética ⁷³.

Os principais factores de risco e progressão para a ND mais precocemente são a falta de controlo glicémico e a hipertensão ⁷⁵. O aumento da glicémia no sangue, *per si* pode aumentar os níveis de homocisteína (Hc), e terapêutica com insulina pode inibir a actividade enzimática da *CβS* e aumentar a da *MTHFR*, que consequentemente leva a um aumento da Hc, assim como pode levar a um nível de auto-oxidação e a glicação de proteínas associados a processos inflamatórios e a aceleração de aterosclerose. Assim os níveis de Hc são inversamente relacionados com a resistência à insulina, estando, segundo um estudo este controlo da glicémia mais associados ao sexo masculino ⁷³.

Os rins desempenham um papel importante na homeostasia da glicose ²⁹. Em pacientes com DPRAD e sem diabetes mostram uma tolerância diminuída à glicose. Em jejum as concentrações de glucose e insulina são normais ou ligeiramente aumentadas, enquanto que as concentrações de pró-insulina e péptido-C são ligeiramente aumentadas. Em termos fisiológicos, insulina no soro e as concentrações molares do péptido-C são iguais ⁴¹. A insulina é metabolizada principalmente no fígado e o péptido-C é degradado no rim.

No estudo MDRD verificou-se que doentes com ND eram os que demoravam menos tempo até aos estádios 4 e 5, em relação a outros diagnósticos que levam também à DRC ⁷⁶. No entanto, a DPRAD foi associada também a um declínio rápido da TFG. Numa análise secundária SHARP (*Study of heart and renal protection*), os pacientes com DPRAD tinham um risco 3 vezes maior da insuficiência renal crónica e um menor risco de mortalidade inexplicável, enquanto que os com ND tinham um risco para a insuficiência renal crónica idêntico as outras patologias, mas uma probabilidade muito maior de morrer antes de chegarem ao estadio 5 da doença renal crónica ⁷⁷.

Um estudo da OMS demonstrou que pacientes tanto de tipo I como II de Diabetes Mellitus têm quase o dobro da mortalidade de DCVs quando tiveram microalbuminúria. É também um facto de risco para a doença isquémica do coração e para a insuficiência cardíaca, tanto em pacientes com ND com DCR como com DRT ⁷⁸.

Os mecanismos que conduzem ao desenvolvimento de hiperfiltração glomerular em pacientes com nefropatia diabética ainda não são totalmente entendidos, no entanto têm sido propostas várias hipóteses como a hiperfiltração glomerular em diabetes poder ser resultado também da reabsorção tubular proximal da glicose e de sódio, que provoca vasodilatação secundária que suprime feedback tubuloglomerular ⁶⁶. Ao nível celular, as

elevadas concentrações de glicose no filtrado glomerular de pacientes com diabetes promove a reabsorção de sódio e insulina no túbulo proximal ⁷⁹.

Em indivíduos com ND o controlo da glicose é uma ferramenta fundamental para evitar a progressão, assim como o controlo da ingestão de sódio, proteínas, diminuição de lípidos com estatinas e cessação do tabagismo ¹.

Em pacientes com ND tem sido também observado um aumento da sinalização de ON intrarenal ⁸⁰.

1.10. Metabolismo da Homocisteína

A homocisteína (Hc) é um aminoácido com um grupo tiol, que permite à molécula fazer ligações peptídicas estáveis, formado exclusivamente a partir da desmetilação da metionina resultante da dieta ou do seu catabolismo ⁸¹. Ao contrário de outros aminoácidos com enxofre, a Hc não é incorporada em proteínas ⁸².

A homocisteína plasmática pode ser encontrada na forma livre e maioritariamente oxidada, representando entre 20 a 30%, ou ligada a outras proteínas plasmáticas (70-80%), principalmente à albumina e à hemoglobina ⁸³.

O metabolismo da Hc encontra-se na intersecção de duas vias: via da transulfuração e a via da transmetilação. Permite ainda estabelecer a ligação entre o ciclo do folato e da metionina (Figura 2).

A Hc surge durante o metabolismo da metionina, através da sua activação pela enzima S-adenosilmetionina (SAM) pela enzima metionina adenosiltransferase. A SAM é o principal dador de grupos metilo biológicos ⁸⁴. A metil transferase é usada para a metilação de ADN, ARN, síntese de lípidos, proteínas de reparação e síntese de pequenas moléculas – via da transmetilação ⁸⁵.

A remetilação da Hc pode acontecer através do grupo metilo da betaína (metiltransferase) ou através do grupo metilo do 5-metiltetrahydrofolato (metionina sintetase) – via da remetilação ⁸⁶.

A Hc pode ser ainda catabolizada em cisteína (cistationina β -sintase e cistationina γ -liase), através da via de transulfuração.

INTRODUÇÃO

Quando existe alterações na via de transsulfuração (por exemplo, deficiência de $C\beta S$) a sobrecarga de metionina leva a hiperhomocisténemia (HHc) (concentrações elevadas de homocisteína plasmática) ⁸⁷.

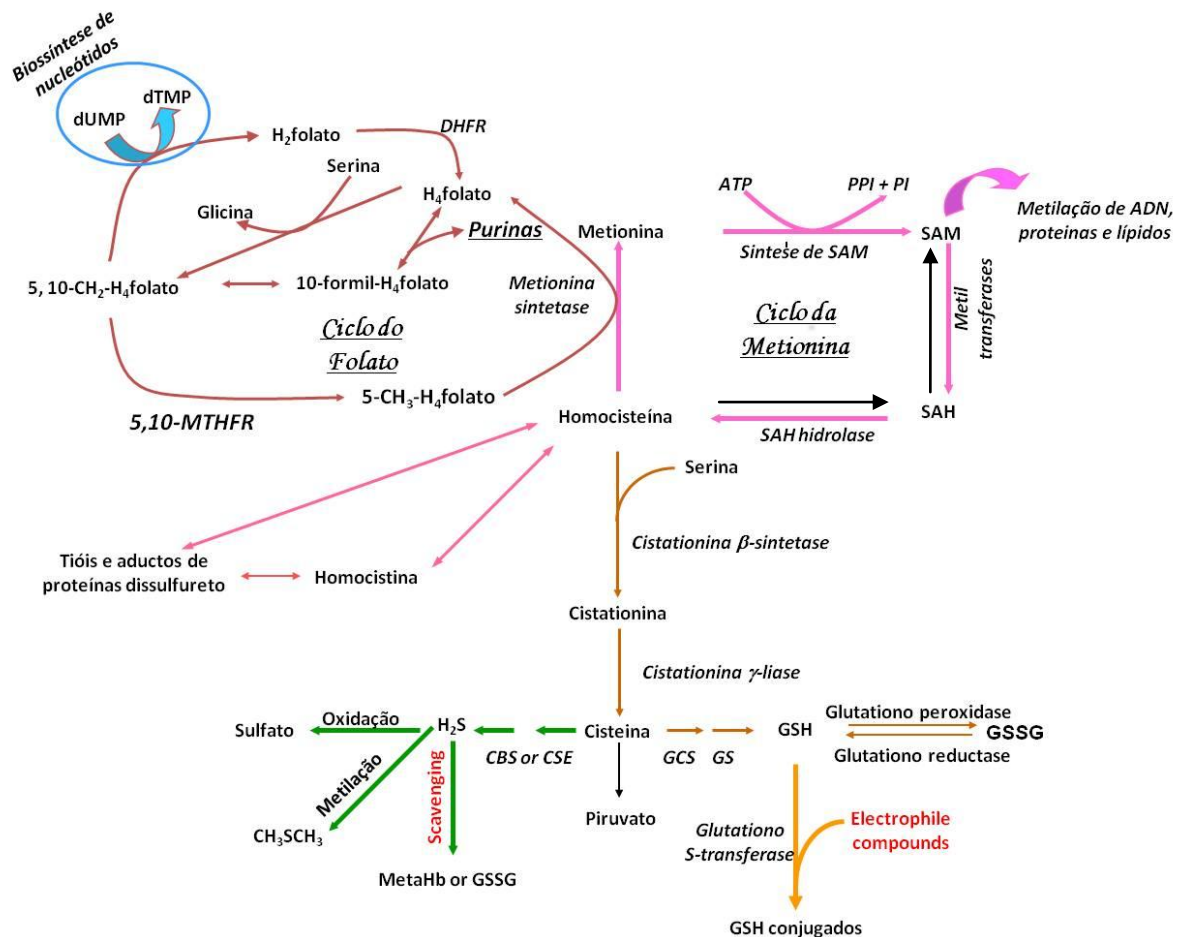


Figura 2: Esquema da via do metabolismo da homocisteína.

dUMP, monofosfato de uridina ; dTMP, monofosfato de timidina; *MTHFR*, 5,10-metilenotetrahidrofolato redutase; *DHFR*, dihidrofolato redutase; SAM, S-adenosilmetionina; SAH, S-adenosilhomocisteína; CBS, cistionina β-sintase; CSE, cistionina γ-liase; GCS, glutamilmcisteína sintetase; GS, glutatio sintetase; GST, glutatio S-transferase; GSH, glutatio reduzido; GSSG, glutatio oxidado. Adaptado de Marinho et al., 2007 ⁸⁸

O aumento de folato pela dieta ou por suplementos leva a um aumento de 5-metilotetrahidrofolato (5-MTHF) e que conseqüentemente leva a um aumento de SAM do ciclo da metionina. Este aumento leva a uma activação da via de transsulfuração pelo aumento da $C\beta S$ e a uma inibição da via de desmetilação, causando uma diminuição dos níveis de Hc. Assim SAM funciona como um activador da $C\beta S$ e um inibidor alósterico da MTHF redutase (*MTHFR*) ⁸⁹.

Em condições oxidativas, a via da transulfuração é favorecida pela formação de cisteína e glutatióno. Desta forma, stress oxidativo aumenta a catabolizada pela *CβS*, diminuindo a desmetilação para manter o pool intracelular de glutatióno (auto-regulação redox) ⁹⁰.

A hiperhomocisténúria foi descrita como presente em sujeito com DCV e tem sido associado também a pacientes com DRC e com HTA ^{91,92}. A HHc é também frequentemente observada em pacientes com DRC em estádios avançados ⁹³.

O aumento da concentração plasmática do aminoácido pode causar lesões no endotélio, resultando em aterosclerose, uma vez que é responsável pela ⁹⁴:

- Diminuição da actividade peroxidase do glutatióno, diminuindo a actividade antioxidante celular, potenciando a sobrecarga oxidante⁹⁵;
- Alteração dos níveis de factores de coagulação e consequente alterações dos mecanismos de coagulação⁹⁶;
- Indução da proliferação de células musculares lisas da parede das artérias, aumentando a síntese de ADN e diminuindo as células endoteliais⁹⁷;
- Hipometilação do ADN ⁷³.

Existem factores fisiológicos como a idade e o sexo que também influenciam os níveis mais elevados de Hc, tendo os homens valores superiores às mulheres, mesmo em idades pós-menopausa. No que diz respeito à idades os níveis aumentam ao longo do tempo⁹⁸. Assim, como deficiência de vitaminas do complexo B, insuficiência renal ou interferência no metabolismo da Hc por drogas ou alterações metabólicas são também factores relacionados com a HHc e associação a DCV⁹⁹.

Factores genéticos relacionados com a via da Hc estão também relacionados com a presença de hiperhomocisteinúria, como é o caso de mutações na *CβS* e na *MTHFR*.

Geralmente quando existe um comprometimento da via da remetilação da Hc, mesmo que leve, irá levar a um aumento da concentração do aminoácido no plasma em condições de jejum. Já quando o comprometimento ocorre na via da transulfuração da Hc, os aumentos desta são muito mais ligeiros do que no 1º caso ¹⁰⁰.

Em suma, os níveis de Hc são influenciados por factores genéticos e pela dieta, principalmente pelo consumo de metionina e vitaminas B6, B9 e B12 ⁹⁴.

Muitos pacientes que se encontram em diálise têm a vitamina B12 em baixas concentrações¹⁰¹. Estes pacientes de uma forma geral têm uma má nutrição o que tem influência na falta de vitaminas, tem um estado inflamatório crónico e estas condições levam

INTRODUÇÃO

a uma relação da HHc com os eventos e riscos CV ¹⁰². Para além disso, alimentos fontes de vitamina B12 contêm também concentrações elevadas de eletrólitos, que são perigosos para pacientes que realizam diálise. Além disso, a vitamina B12 é uma molécula química de porte médio e pode ser apurada com novos dialisadores de alto fluxo ¹⁰¹.

Os níveis baixos de folato que são também influenciados pelo metabolismo da Hc podem aumentar o risco de HHc. Uma condição que é encontrada em 77% dos doentes hipertensos ¹⁰³.

Os pacientes com insuficiência têm o parênquima renal danificado e como tal tendem a ter níveis mais elevados de Hc, do que pacientes com outras doenças ⁷³. Hultberg et al., mostraram que pacientes com DRC estadio terminal tinham níveis mais elevados de Hc ¹⁰⁴. A diálise agrava a deficiência de vitaminas B6 e B12, assim como os níveis de folato e a acumulação de metabolitos intermediários como HSA e sulfatos podem suprimir ainda mais as vias metabólicas da Hc. No entanto, a via da transsulfuração parece normal no início da doença renal e torna-se saturada com Hc à medida que a doença progride ⁷³.

1.11. Genes modificadores

1.11.1. Haptoglobina

Haptoglobina (*Hp*) consiste numa proteína de fase aguda presente no plasma, onde se liga com alta afinidade à hemoglobina (Hb) livre, formando um complexo que não pode ser filtrado pelo rim e que será eliminado por hepatócitos (dissociação do complexo e conversão da Hb em bilirrubina) ¹⁰⁵. Ao fazer parte do mecanismo de eliminação da Hb livre pós-hemólise, a *Hp* protege o organismo (tecidos) de diversas lesões oxidantes por parte do ferro (ex.: acumulação de radicais livres através de reacções de Fenton) e tem ainda propriedade imunomoduladoras ¹⁰⁶.

A sua produção dá-se principalmente ao nível dos hepatócitos, consistindo num tetrâmero formado por quatro cadeias polipeptídicas, duas α (apresentam um local específico de ligação à Hb) e duas β (apresentam dois locais de ligação à Hb), conectadas por pontes persulfureto ¹⁰⁷.

No sere humano o gene *Hp* localiza-se no cromossoma 16q22 e apresenta dois tipos de alelos, denominados *Hp1* e *Hp2*, que originam três fenótipos diferentes da proteína, com diferentes propriedades: *Hp1-1* (86kDa), *Hp 2-1* (86-300kDa) e *Hp 2-2* (>200kDa) ¹⁰⁸. De facto, observa-se que a síntese de *Hp* é induzida por diversas citocinas, sendo característico de proteínas de fase aguda ¹⁰⁹

A *Hp* é produzida e tem funções durante a resposta inflamatória, sendo observado um aumento da sua concentração em situações de lesão tecidual/necrose. Nestas situações além da captação de ferro pós-hemólise que previne o uso deste por bactérias,¹¹⁰ a *Hp* está envolvida na: Modulação das funções de linfócitos e macrófagos (ex.: fenótipo da *Hp* modula produção de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias em macrófagos expostos a Hb livre¹¹⁰; Fagocitose, sendo a *Hp* captada por neutrófilos e segregada durante este processo imunitário¹¹¹; Inibe resposta quimiotáctica e actividade bactericida intracelular em granulócitos¹¹²; Estimula angiogénese¹¹³ e promove a diferenciação e proliferação do endotélio vascular e a formação de novos vasos sanguíneos¹¹⁴.

Relativamente aos fenótipos da *Hp* e a sua relação com estes processos, verifica-se que o *Hp1-1* capta com maior afinidade a Hb livre (reduzindo respostas inflamatórias associadas) e que protege contra o desenvolvimento de nefropatias em pacientes diabéticos¹¹⁵. O *Hp 2-2* e o *Hp 2-1* apresentam menor afinidade de ligação à Hb livre, sendo o *Hp 2-2* o que apresenta afinidade mais baixa e estando associado a doenças cardiovasculares e mais propensos ao stress oxidativo^{106,116}. No entanto fenótipo homozigótico para o alelo *Hp2* tem maior actividade angiogénica que os outros fenótipos¹¹⁷.

Recentemente observou-se que os efeitos da *Hp* na insuficiência renal crónica apresentam ser dependentes da idade, estando o fenótipo *Hp1-1* associado a um decréscimo na mortalidade em indivíduos diabéticos idosos e o *Hp2-2* apresenta o mesmo efeito em indivíduos mais novos¹¹⁵. Armaly et al., mostrou que 73% da população de estudo com DRC tinha o fenótipo 2-2 e que existia um aumento mais evidente nestes pacientes de biomarcadores que representam a oxidação de proteínas no plasma, e são mais sensíveis também ao stress oxidativo, o que sugere que o polimorfismo da *Hp* tem um papel importante na patogénese do stress oxidativo em indivíduos com DRC¹¹⁶. Após ajuste para as variáveis, o fenótipo continuou a estar relacionado com a DRC, assim como a HTA, a diabetes e dislipidemia¹¹⁶.

A acumulação de espécies reactivas de oxigénio produzidas por neutrófilos e macrófagos activados causam alterações no citoesqueleto e stress no retículo endoplasmático, causando a peroxidação lipídica local produzindo alterações na permeabilidade glomerular e levando à fuga de proteínas para a capsula de Bowman¹¹⁸.

A distribuição dos fenótipos depende das populações em estudo. No caso do fenótipo 1-1 este é mais comum em Nigorianos, em habitantes da Ilha da Páscoa e índios Chilenos¹¹⁹. O fenótipo 2-1 é mais comum em europeus, americanos e africanos¹¹⁹, enquanto que o fenótipo 2-2 é mais frequente em na Jordania, na Austrália e em algumas populações na China e na Índia.^{120,121}

INTRODUÇÃO

As mulheres de uma regra geral tem uma maior concentração de *Hp* e à medida que a idade aumenta, também os níveis de *Hp* são mais elevados ¹²⁰.

O fenótipo homozigótico 2 em doentes diabéticos aumenta a probabilidade de nefropatias ou retinopatias ¹²², assim como a associação entre este fenótipo e as doenças que conduzem a hipertensão e doenças cardiovasculares ¹²³. Devido as diferentes afinidades de da *Hp* com a hemoglobina (Hb) dependendo do fenótipo da *Hp*, estas divergências levantam a possibilidade de certos polimorfismos de *Hp* estarem relacionados com a DRC e com a falha do rim ¹²⁰. No entanto, existem alguns dados em conflitos consoante as populações e a associação entre os fenótipos de *Hp* e a nefropatia diabética ¹¹⁷.

Awadallah mostrou no seu estudo sugere que possa existir uma relação entre o fenótipo 2-2 e a ocorrência de DRC em pacientes com DPR, visto que a grande maioria dos pacientes com DPR no estudo tinham este fenótipo de *Hp* ¹²⁰.

Por análise multivariada, Chen et al., mostraram que o fenótipo *Hp* 2-2 é um factor independente para o desenvolvimento de DRC e que o alelo *Hp2* é sobreexpresso nestes doentes ¹¹⁷.

O genótipo *Hp2-2* estão em maior risco de desenvolver DRC do que aqueles com factores de risco tradicionais, tais como diabetes, hipertensão e dislipidemia, embora não existem estudos comparáveis na literatura ¹¹⁷.

No Pittsburgh Epidemiology of Diabetes Complications (EDC) foram realizados estudos em pacientes com DM tipo I e foram observados aumentos da doença arterial coronária quando o alelo da *Hp-2* está presente, mas está inversamente relacionado com AVC's ¹²⁴.

Um relatório de Epidemiologia de complicações de diabetes referiram que o fenótipo 2-2 em indivíduos com diabetes tipo 1 e 2 têm uma maior incidência de DCV ¹²⁵ e um maior declínio da função renal e um aumento para a drc de estadio 5 . Orchard et al., apenas confirmaram associação com a diabetes tipo 1 e o fenótipo 2-2. ¹²⁶.

Assim, o fenótipo 2-2 da *Hp* pode ajudar a prever o risco CV em pacientes com DRC assim como já foi demonstrado em diabéticos ¹²⁷.

1.11.2. *Glutathione S-transferase*

O glutathione é um antioxidante, antitoxina e um cofactor enzimático que, devido a sua solubilidade existe em grande concentração dentro das células ¹²⁸.

As transferases do glutationo são historicamente designadas por glutationo S-transferases (GST). Estas são enzimas encontrados em diversos organismos e catalisam o ataque nucleófilo pelo glutationo reduzido a vários compostos não-polares que contenham um carbono eletrófilo. Estes compostos podem ser endógenos e exógenos (xenobióticos) como drogas quimioterapêuticas, poluentes ambientais entre outros ¹²⁹.

Os GSTs estão presentes em grandes quantidades no tecido hepático, representando cerca de 10% da proteína total do fígado de rato. A indução do GST hepáticos por acção de antioxidantes ou outros xenobióticos anti-carcinogénicos ¹³⁰, permite que os animais se tornem mais tolerantes a carcinogénicos e ao stress oxidante, chegando a compreender cerca de 20% da proteína total do fígado do animal ¹²⁹.

A função dos enzimas GST são: Catálise da conjugação de electrólitos com o GSH; Catálise da redução de hidroperóxidos de lípidos pelo GSH e; Transporte intracelular ¹³⁰.

Os S-transferases do glutationo M1 (*GSTM1*) membro da família do μ e o S-transferase do glutationo T1 (*GSTT1*), membro da família θ apresentam polimorfismos nos Humanos e encontram-se nos localizados no cromossoma 1p13.3 e 22q11.2, respectivamente ¹³¹. No rim humano o GST de classe μ está principalmente localizada nos túbulos renais, enquanto que a classe θ está principalmente expressa nos rins e no fígado ¹³². A deleção destes genes, homozigóticos para a deleção que conduz à ausência da actividade dos enzimas *GSTM1* e *GSTT1* ¹³³, diminuindo a capacidade de metabolização de alguns xenobióticos, diminuindo as defesas antioxidantes e levando à acumulação de espécies reactivas de oxigénio e consequentemente à perda de função renal ¹³⁴, e podendo aumentando o risco de certos tipo de cancro, como os na bexiga e rins ¹³⁵.

Alguns estudos focam a associação entre os genótipos dos GSTs e as doenças cardiovasculares reportando para um efeito protector dos genótipos nulos nestas doenças, até porque, uma actividade mais elevada dos enzimas codificados por estes genes leva à depleção de glutationo devido ao aumento da conjugação destes com o xenobióticos activados pelo sistema do citocromo P450 na fase I da metabolização destes compostos. A depleção de GSH conduz à sobrecarga antioxidante o que pode levar à doença hipertensiva ¹³⁶. No entanto, outros apresentam informação contrária, isto é, que indivíduos com genótipo nulo no gene da *GSTT1* e *GSTM1* que têm uma maior risco de DCV, uma vez que o enzima está envolvido na biotransformação de vários compostos reconhecidos como factores de riscos para a DCV ¹³⁷ e o mesmo se verifica em pacientes com DMII ¹³⁸.

Chang et al., mostraram que o alelo nulo da *GSTM1* influencia a progressão da DRC numa população de Afroamericanos ¹³⁹. O mesmo verificou Lin et al., em que indivíduos em diálise

INTRODUÇÃO

com deleção em *GSTM1* apresentavam maior taxa de mortalidade ¹⁴⁰. Suvakov et al., obtiveram os mesmos resultados mas com uma descoberta nova, a associação entre o genótipo nulo e a morte por acidentes vasculares cerebrais (AVC) em pacientes com DRT, devido também ao stress oxidativo relacionado com a diálise ¹⁴¹. Tendo em conta que na DRC a *GSTM1* é upregulated em resposta a uma protecção ao aumento do stress oxidativo, parece legítimo propor que esta variante genética pode prejudicar em termos de aterosclerose em doentes com DRT ¹⁴².

Gutiérrez-Amavizca et al., sugerem que a presença do genótipo nulo de *GSTM1* sozinho ou na presença de *GSTT1*, que podem contribuir para o desenvolvimento de DRT ¹⁴³.

Recentemente, tem sido demonstrado que a susceptibilidade ao stress oxidativo na DRC é influenciada pelos polimorfismos da GST, devido às suas funções anti-oxidantes e de desintoxicação. De acordo com a presença do polimorfismo no gene da GST, pacientes com DRT podem ser estratificados com base no nível stress oxidativo e nitrosativo. Uma vez que estes parâmetros de stress estão correlacionados com as DCV e que o stress oxidativo desempenha um papel chave na patogénese e progressão da DCV ¹⁴¹.

Aproximadamente 50% da população caucasiana apresenta deleção no gene da *GSTM1* ¹⁴⁴ e 58,3% da população chinesa ¹⁴³. No caso da *GSTT1* apenas 20% apresenta deleção, isto em caucasianos ¹⁴⁵, e entre 13 a 26% nos casos dos asiáticos ¹⁴⁶.

Agrawal et al., em pacientes com DRC no Norte da Índia relacionaram os 2 polimorfismos da GST (*GSTT1* e *GSTM1*) com um aumento para o risco de desenvolver DRC de estadio terminal ¹⁴⁷.

A GST está relacionada com a HTA uma vez que estão envolvidos no metabolismo de espécies reactivas de oxigénio (ERO) e podem exercer algum papel na regulação da pressão arterial, devido aos mecanismos de vasoregulação ¹⁴⁸.

A presença dos genótipos nulos da *GSTT1* e *GSTM1* estão associadas a um elevado nível de stress oxidativo tanto em diabéticos como em não diabéticos na população com DRC ¹⁴⁹.

1.11.3. Metilenotetrahidrofolato redutase

A metilenotetrahidrofolato redutase (*MTHFR*) é uma flavoproteína homodimérica responsável pela síntese de 5-MTHF, o principal dador de metilo na remetilação da homocisteína a metionina ¹⁵⁰. A *MTHFR* encontra-se no cromossoma 1 (1p36.3) ¹⁵¹, cada

subunidade do *MTHFR* contém um domínio catalítico N-terminal de 40kDa e um domínio regulatório C-terminal de 37kDa ¹⁵².

Observou-se que uma mutação de substituição de uma citosina por uma timina na posição 677 do gene do *MTHFR* (polimorfismo C677T) pode induzir hiperhomocisteinemia, principalmente se o genótipo for TT e existirem baixas concentrações de folato ^{86,153}. Esta mutação é um factor genético de risco para doença cardiovascular, sendo responsável pela substituição do aminoácido valina por alanina ⁹³. No entanto, alguns estudos que revelam que a mutação por si só não associada com o desenvolvimento de trombozes ou doenças oclusivas venosas ¹⁰⁰. Esta substituição dá origem a uma forma termolábil do MTHFR que apresenta menor actividade catalítica, reduzindo a estabilidade térmica da enzima a 37°C ou superior ¹⁵⁴, contudo esta situação pode ser estabilizada pelo consumo de folato ¹⁰⁰, que força a reacção do MTHFR no sentido de formação de metionina ¹⁵⁴. Observou-se que concentrações elevadas de homocisteína e baixas concentrações de folato podem induzir uma condição inflamatória, sendo esta verificada em situações de baixo consumo de vitamina B e folato na dieta ⁸³. Desta forma, verifica-se uma correlação positiva entre a deficiência de vitamina B12 e o desenvolvimento de HHc, estando o baixo nível de folato quase sempre associado também ao baixo nível de vitamina, tornando assim, inadequada a remoção de Hc ¹⁵⁴.

A prevalência de *MTHFR* 677 C>T é variável, dependendo da etnia e localização. A frequência do alelo é maior em italianos e hispânicos e menor em afroamericanos e de africanos sub-saarianos, a mesma frequência de distribuição é observada para a homozigotia da mutação ¹⁵⁵. O genótipo mais frequente observada na população é o heterozigótico, seguido do homozigótico sem mutação e por fim o com mutação. Os heterozigóticos têm aproximadamente 60% da actividade normal ¹⁵⁶.

A propriedade das citocinas pró-inflamatórias secretadas afectam a função endotelial e que, juntamente com o pouco metabolismo de folato, afectado pela mutação em *MTHFR* pode resultar em aterosclerose e aumentar a prevalência de DCV em pacientes que façam hemodiálise ¹⁵⁷. Um número de mecanismos têm sido sugeridos para explicar a relação entre a disfunção endotelial e a vasodilatação anormal que é reforçado quando existe HHc, como é o caso das espécies reactivas de oxigénio e a reduzida proliferação de células endoteliais progenitoras ¹⁵⁸.

O polimorfismo C677T do *MTHFR* está associado a um aumento do risco de HTA ¹⁵⁹ e de AVC ¹⁶⁰. Inclusivamente, um estudo mostrou uma elevada frequência do genótipo TT do gene da *MTHFR* (25%) em indivíduos adultos de diferentes regiões da China hipertensos ¹⁶¹. A HTA

INTRODUÇÃO

está estreitamente relacionada com um aumento do nível de Hc ¹⁶². Uma meta-análise por Yang et al., conclui a mesma coisa ¹⁶³.

Curiosamente a influência do polimorfismo C677T do *MTHFR* sobre a concentração de homocisteína em jejum é observável em pessoas do sexo masculino mas atenuada em mulheres pré-menopausicas ¹⁶⁴. Também se verifica que o polimorfismo pode ser um factor de risco na diabetes tipo 2, nomeadamente em pacientes do sexo masculino ¹⁶⁵. Estes dois factos sugerem que o estado hormonal pode afectar o metabolismo da homocisteína. No entanto, Ji et al., observaram que em indivíduos com o genótipo TT os níveis de Hc eram mais elevados em ambos os sexos ¹⁶¹.

Em indivíduos com a mutação homozigótica termolábil os níveis de Hc em jejum foram 1,4 vezes mais elevados do que em indivíduos sem anormalidades genéticas nesta mutação ¹⁶⁶. O genótipo TT da mutação tem sido frequentemente estudado e relatado que indivíduos com esta mutação têm como significativamente um valor mais elevado de Hc em várias populações ¹⁶⁷.

A mutação TT na posição 677 do gene da *MTHFR* foi também relacionada com a doença arterial coronária (DAC) numa meta-análise com 11 162 casos ¹⁶⁸. Esta mutação foi também bastante estudada como factor para a arteriosclerose ¹⁶⁹.

Estudos entre a relação do polimorfismo da *MTHFR* e a patogénese da doença renal tem tido resultados discrepantes ¹⁷⁰. Bloudíčková et al., focaram-se na heterogeneidade dos doentes em HD e populações saudáveis, e os seus resultados suportam a ideia de que a mutação homozigótica TT da *MTHFR* é dos factores causadores envolvidos nos danos renais e na DRC. Verificando inclusivamente uma associação entre os SNP's do gene da *MTHFR* com o desenvolvimento de algumas causas da DRC, mas não estão relacionados com a duração da HD ¹⁷¹.

Assim, a presença da mutação do genótipo 677TT da *MTHFR* é considerada um factor de risco para as DCV ¹⁷².

Dong e os seus colaboradores tentaram relacionar o genótipo da *MTHFR* com a função renal e demonstraram que existe associação com os indivíduos do sexo masculino Chineses hipertensos para o alelo T da *MTHFR*, associação essa que se mantém depois de um ajuste par a idade, o IMC e a pressão arterial, implicando este gene na patogénese da DRC ¹⁷³. Alguns estudos encontraram também uma correlação negativa entre a concentração de Hc no plasma e a função renal, como por exemplo no estudo NHANES III em que o risco para a DRC definido pela TFG em indivíduos com elevados níveis de Hc foi 40 vezes superior ao de baixo nível. No entanto, ainda não se entende bem se a HHc é um

verdadeiro factor que leva à diminuição da função renal, ou se é apenas um marcador para esta ¹⁷³.

O polimorfismo da *MTHFR* foi associado com o aumento do risco de nefropatia diabética em populações caucasianas com DM tipo II ¹⁷⁴ e ainda em populações árabes ¹⁷⁵ e chinesas ¹⁷⁶.

Os pacientes em hemodiálise que são homozigóticos para a mutação da *MTHFR* têm um aumento dos valores de Hc ¹⁷⁷. Uma vez que uma meta-análise recente na população asiática encontrou associações entre o desenvolvimentos de ND e os polimorfismos TT da *MTHFR* ¹⁷⁸.

Dado o facto de que a função renal e a Hc estão bem correlacionados e que C677T é um dos principais determinantes da homocisteína, é importante verificar C677T está associada com função renal nas populações com DPRAD.

1.11.4. Cistationina β -sintase

A enzima da cistationina β -sintase está envolvida no ciclo da Hc na via de transsulfuração. É graça à *C β S* que a Hc é convertida em cistationina e que em última análise origina o glutatão. ⁷³

A *C β S* tem uma estrutura modelar e um mecanismo de regulação complexa, contendo 4 subunidades idênticas. Cada uma tem um domínio catalítico N-terminal que contém os locais para as ligações do grupo heme, substrato para a pirodoxal 5' fosfato e um domínio C-terminal que se liga a SAM ¹⁷⁹. Uma forma activada da enzima é formada mediante o truncamento do domínio regulador do C-terminal. As enzimas truncadas têm um turnover 4 vezes superiores do que da enzima completa na ausência de SAM ¹⁸⁰.

São conhecidas aproximadamente 160 mutações no gene da *C β S* humano, que se encontra localizado no cromossoma 21q22.3 ¹⁸¹. Muitas das mutações são missense e estão localizadas no domínio catalítico da proteína ¹⁸⁰.

Uma das mutações mais comum no gene da *C β S* envolve a inserção de 68 pares de bases (pb) na região codificada pelo exão 8 (844ins68) que duplica a fronteira intrão/exão no terminal 5' (Griffion et al., 2005-projecto), que local de splicing alternativo ^{182,183}. A mutação T833C também relacionada com o polimorfismo de inserção, uma vez que está presente em todos os alelos quando existe a mutação 844ins68 ¹⁸³.

INTRODUÇÃO

A frequência do polimorfismo de inserção varia bastante consoante a população. Em 1998 Franco et al. descreveu que o genótipo heterozigótico da mutação 844ins68 era de 37.7% em África, 13.5% na Europa e de apenas 0.9% em Americanos com origens indígenas¹⁸⁴. A mutação foi também encontrada em indivíduos normais italianos e irlandeses, com um prevalência variando entre os 7,5% e os 18,8%, respectivamente^{182,183}.

A variante 844ins68 do gene da *CβS* parece estar associada ao aumento da transcrição genética, bem como a um aumento da actividade do enzima. Assim, a presença do alelo está associada a uma remoção mais eficiente da homocisteína através da via da transsulfuração, que pode assim ser considerado protector contra determinadas patologias, como por exemplo, a diminuição do risco de doenças cardiovasculares^{150,185,186}. Embora o mecanismo exacto pelo qual o alelo 844ins68 afecta a função de *CβS* ainda não seja conhecido, pensa-se que aumenta a actividade através da upregulation da quantidade de ARN mensageiro¹⁸⁷. A remoção mais eficiente de Hc na presença do alelo de inserção pode ser também associada a uma ingestão alta de metionina¹⁸⁵. Sendo protetoras á níveis mais normais de Hc no sangue e na urina, o que está também relacionado com a protecção renal.

O sulfureto de hidrogénio (H_2S) é um gasotransmissor que exerce efeitos benéficos através das suas acções antioxidantes e anti-inflamatórias¹⁸⁸. O rim é um dos principais órgãos de regulação endógena de H_2S através da *CβS*. Num estudo recente Wang et al, acreditam que existem evidências de que quando existe mudanças na expressão de *CβS*, por isquémia renal, que a produção de antioxidantes, como o H_2S endógeno e o glutatono, são reduzidos e existe uma libertação de citocinas inflamatórias expressas no rim e nas células tubulares¹⁸⁹.

Esta mutação foi investiga como um factor de doença arterial oclusiva e para HHc por vários grupos mas os resultados foram contraditórios¹⁶⁶, uma vez que existem estudo que afirmam que se trata de uma inserção neutra ou mesmo de protecção contra o desenvolvimento de HHc, em que foi relatada uma prevalência ligeiramente superior em pacientes com HTA prematura e com esta mutação¹⁶⁶.

Algumas justificações possível para as diferenças encontradas entre estes estudos e a função protectora ou não do polimorfismo da *CβS* podem ser as diferentes origens genéticas das populações^{190,191} ou as percentagens de indivíduos com deficiência de vitamina B12, visto que é um cofactor para a enzima metionina sintase que desempenha um papel importante no metabolismo da Hc¹⁹².

Janosikova et al., obtiveram uma associação entre 844ins68 e a diminuição do risco de doença arterial coronária (DAC). Propondo, assim que a mutação tinha um efeito protector devido às melhoras na via da transsulfuração e metilação ¹⁸⁵.

Num estudo recente, Kumar et al., não observaram qualquer individuo homozigótico para a inserção de 68pb na população em estudo. Frequência essa comparável a outras encontradas nos EUA, no Iraque e na Turquia ¹⁶⁷.

Alguns investigadores, propuseram uma relação causal entre a isquémia renal leve e o aumento da Hc ¹⁹³. Pensa-se que a estenose da artéria renal é exemplo de isquémia de lesão renal associada normalmente a um grau leve de DRC ⁹³.

OBJECTIVOS

2. OBJECTIVOS

A doença poliquística renal autossómica dominante é a doença monogénica que mais frequentemente causa hipertensão arterial. Doentes com esta patologia têm tendência a evoluírem para a doença renal crónica, no entanto, a progressão para estas fases é dotada de muita heterogeneidade clínica.

Os objectivos gerais deste trabalho foram: estudar a susceptibilidade genética e o efeito da relação genótipo-fenótipo sobre a progressão para a doença renal crónica em indivíduos com a doença poliquística renal autossómica dominante comparativamente a uma doença multifactorial como a Diabetes *mellitus* II.

Para tal, os objetivos específicos foram:

- 1) Determinar os polimorfismos genéticos da *MTHFR*, *CβS*, *GSTT1/M1* e o fenótipo da *Hp* em indivíduos com doença poliquística renal autossómica dominante, em indivíduos com doença renal terminal, diabetes *mellitus* II, diabetes *mellitus* II com doença renal crónica e controlos sem doença aparente;
- 2) Analisar alguns parâmetros antropométricos, bioquímicos do eritrócito e plasmáticos (fenótipo intermédio) relevantes na doença poliquística renal autossómica dominante e doença renal crónica;
- 3) Analisar o efeito da relação genótipo-fenótipo -bioquímico envolvidos na progressão para a doença renal crónica.

MATERIAIS E MÉTODOS

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Caracterização da Amostra Populacional

O presente estudo incidiu numa amostra de indivíduos com doença poliquística renal e doença renal crónica seguidos no serviço de Nefrologia e Transplantação Renal do Hospital de Santa Maria. Foram estudados 286 indivíduos [(DPRAD (N=150), DRT (N=94)], sendo a maioria do sexo masculino (51.6%) e com idades compreendidas entre os 19 e os 91 anos. Nesta amostra foram identificados 42 (30.7%) indivíduos com DMII associada à disfunção renal.

No que diz respeito à progressão para a DRC e tendo em conta os objetivos do estudo, foi também incluída uma população de 144 indivíduos com DMII, dos quais 95 (66.0%) apresentavam algum grau de disfunção renal, 79 (48.8%) do sexo feminino e 83 (51.2%) do sexo masculino. Estes indivíduos foram recrutadas na Associação Protectora dos Diabéticos de Portugal, no âmbito de um estudo epidemiológico observacional analítico do tipo caso-controlo, baseado nos resultados do projeto “Hábitos alimentares, hiperhomocisteinémia e doença cardiovascular na Diabetes tipo 2” financiado pela Fundação para a Ciência e Tecnologia com a referência PIC/IC/82957/2007.

Como controlo foram consideradas quatro grupos ajustados para o género (N=494): uma amostra de 140 mulheres (28.3%), recrutadas no âmbito de um projecto relacionado com os efeitos do exercício físico em marcadores de risco cardiovascular, em colaboração com a Faculdade de Motricidade Humana, em que a componente genética e bioquímica foi realizada por uma estudante de Mestrado no Laboratório de Genética; outra amostra de 129 mulheres (26.1%) recrutadas no serviço de Obstetria e Ginecologia da Maternidade Júlio Diniz, Hospital Maria Pia, em que realizei a genotipagem dos polimorfismos da *GSTT1/M1*; uma amostra de 26 indivíduos do sexo masculino (5.3%) seguidos na Clínica de Endocrinologia, Diabetes e Metabolismo de Lisboa Lda.; uma amostra de 199 dadores de sangue (40.3%) recrutados no Instituto Português do Sangue, sendo que apenas foram considerados os indivíduos do sexo masculino. Nos últimos dois grupos, a determinação dos polimorfismos foi realizada no Laboratório de Genética da Faculdade de Medicina de Lisboa, no âmbito de estágios para conclusão de licenciaturas. De referir que no grupo controlo foram excluídos os indivíduos com DMII e Nefropatias.

Para todos os indivíduos foram obtidos consentimentos informados por escrito, cumprindo os critérios da Declaração de Helsínquia (anexo 1).

3.2. Função Renal

A função renal foi avaliada e classificada pela determinação de creatinina sérica, sendo a depuração de creatinina endógena calculada a partir da fórmula de Cockcroft-Gault ¹⁹⁴ e, os respectivos estádios de DRC, segundo as recomendações da *National Kidney Foundation* ¹⁹⁵. Relativamente ao declive da creatinina, os indivíduos com valores inferiores ao percentil 25 (-0.004) foram classificados como progressores rápidos, enquanto que indivíduos com valores superiores ao percentil 75 (0.0007) foram classificados como progressores lentos. Já no que concerne à taxa do filtrado glomerular, os indivíduos com uma taxa de perda da função renal inferior ao percentil 25 (-0.2) foram classificados como progressores lentos, enquanto que taxas de função renal superiores ao percentil 75 (4.6) foram classificados como progressores rápidos.

3.3. Medidas Antropométricas

Os dados antropométricos incluídos foram peso e altura, obtidos segundo procedimentos padrão. O índice de massa corporal (IMC) foi calculado usando o algoritmo [peso (Kg)/altura² (m)], tendo sido categorizado de acordo com as classificações da Organização Mundial de Saúde (OMS) em baixo peso (IMC < 18.5 kg/m²), peso normal (IMC = 18.5 a 25 kg/m²), excesso de peso (IMC = 25 a 30 kg/m²) e obesidade (IMC ≥ 30 kg/m²).

3.4. Parâmetros Hemodinâmicos e Bioquímicos

Foram obtidos, no âmbito das respectivas consultas, valores de pressão arterial sistólica (PAS) e diastólica (PAD), a partir dos quais, foi calculada a pressão pulso (PAS - PAD). Os indivíduos foram classificados como hipertensos pela presença de medicação anti-hipertensiva ou medição de pressão arterial, na posição sentada, após 5 minutos de repouso; valores de tensão maior ou igual a 140/90, segundo os critérios da OMS ¹⁹⁶, sendo o diagnóstico confirmado com medições efectuadas até à consulta seguinte.

No que concerne à avaliação bioquímica, foram considerados os seguintes parâmetros: creatinina, ferritina, ferro determinados no plasma por métodos padrão.

3.5. Critérios de Inclusão

Critérios definidos para a DPRAD: Ecografia renal com a presença de pelo menos 3 quistos envolvendo ambos os rins e história familiar de DPRAD num familiar em 1º grau, de acordo com o estabelecido por Ravine¹⁹⁷.

3.6. Colheita e Processamento de Sangue Periférico

A par das consultas referidas e tendo em conta a investigação desenvolvida no Laboratório de Genética, foram colhidas amostras de sangue periférico em tubo com EDTA e tubo seco, devidamente identificados, para os indivíduos estudados. Após a colheita, foi conservado a -20°C, sangue total para, posterior extração de ADN. O plasma foi aliquotado e conservado a -20°C após uma centrifugação a 2000 r.p.m durante 10 minutos à temperatura ambiente. Para o remanescente dos glóbulos vermelhos, uma parte foi usada para determinar a actividade da Redutase Transmembranar (RTM) e o restante foi diluído numa solução de mercapto-etanol a 1/40, para, posterior determinação das atividades da Fosfatase Ácida eritrocitária (FA) e da Redutase da Metahemoglobina (RMHb).

O tubo seco foi centrifugado a 2000 r.p.m durante 10 minutos à temperatura ambiente e o sobrenadante devidamente conservado a -20°C.

3.6.1. Extração do ADN genómico

A partir do sangue total foi realizada a extracção de ADN utilizando o método de salting-out adaptado do método de Lahiri D.K. e Nurnberger Jr J.I.¹⁹⁸, tendo como alterações a utilização de TKM X-100 (2.5% (v/v) de Triton X-100 em tampão TKM 1); IGEPAL (CA 630-Sigma) em substituição do TKM 1 antes da 1º centrifugação e a não colocação do ADN em etanol a 70% seguida de centrifugação depois da precipitação do ADN.

3.6.2. Quantificação do ADN

A determinação da concentração de ADN e da pureza do mesmo foi efectuada espectrofotometricamente através da leitura de absorvência a 260 nm e a razão entre a absorvência a 260 e 280 nm, respectivamente no NanoDrop® (ND-2000, Thermo Scientific) tendo como referência a solução de TE.

3.6.3. Redutase Transmembranar do eritrócito

A actividade deste complexo enzimático nos eritrócitos intacto foi determinada através do seguimento da reacção onde o ferricianeto é convertido a ferrocianeto com a ajuda de uma mistura reaccional, por acção da redutase transmembranar, tal como descrito por Marques *et al.*, 1995, tendo sido medida a sua actividade por espectrofotometria a 535 nm ¹⁹⁹.

3.6.4. Redutase da Metahemoglobina do eritrócito

A actividade da Redutase da Metahemoglobina foi determinada durante a oxidação da dinucleotídio reduzido da nicotinamida adenina (NADH) pelo método de Board modificado ²⁰⁰, sendo terminada por espectofotometria a 340 nm.

3.6.5. Fosfatase Ácida do eritrócito

A actividade da fosfatase ácida eritrocitária foi determinada durante a hidrólise do para-nitrofenilfosfato a para-nitrofenol como descrito por Marques *et al.*, 1996 ²⁰¹ determinada espectrofotometricamente a 405 nm.

3.6.6. Fenótipo da Haptoglobina

As 3 variantes fenotípicas da *Hp* foram determinados usando a técnica de electroforese em gel de poliacrilamida e a sua presença foi detectada pela capacidade peroxidásica do complexo Hemoglobina-Haptoglobina, sendo usada a solução de orto-dianisidina em ácido acético e uma solução de peróxido de hidrogénio para visualização das bandas, segundo o protocolo descrito por Linke ²⁰².

Desta forma é possível observar diferentes padrões de bandas no gel, correspondente aos 3 fenótipos (*Hp* 1.1, *Hp* 2.1 e *Hp* 2.2) (Figura 3)

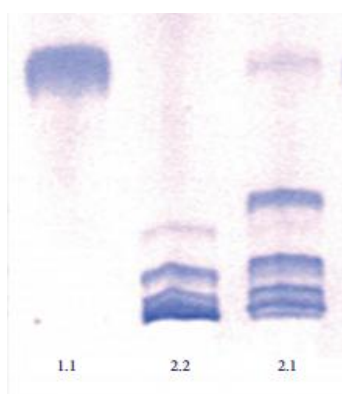


Figura 3: Electroforese em gel de poliacrilamida que evidencia os 3 fenótipos da Haptoglobina.

3.7. Variantes Genéticas Analisadas

Os polimorfismos genéticos analisados foram: o polimorfismo referente ao alelo C677T da *MTHFR*, caracterizado pela alteração de uma citosina (C) numa timina (T) na posição 677¹⁵⁵; a variante 844ins68 do gene da *CβS*, que resulta na inserção de 68 pares de bases, duplicando assim a fronteira intrão/exão no exão 8^{185,203}; e os polimorfismos associados às deleções ou não do gene *GSTM1/T1*^{204,205} (tabela 1).

Tabela 1: Polimorfismos genéticos analisados, localização no cromossoma e respectivas alterações.

Polimorfismo	Cromossoma	Substituição	Alelos
<i>MTHFR</i> C677T (rs1801133)	1p36.3	667	C:T
<i>CβS</i> 844ins68 (SNP de inserção)	21q22.3	844	Delecção:inserção
<i>GSTT1</i>	22q11.2	n.a.	Não nulo:Nulo
<i>GSTM1</i>	1p13.3	n.a.	Não nulo:Nulo

SNP, single nucleotide polymorphism; *Alelos*, ancestral:mutante; *Substituição*, posição da alteração; *n.a.*, não aplicável.

3.7.1. Determinação genética

Os polimorfismos estudados foram determinados pela técnica de PCR que permite que uma zona específica do genoma seja multiplicada em milhões de cópias tendo o conhecimento das regiões ladeadoras da sequência que é pretendida amplificar. Esta reacção baseia-se na reptição de 3 passos: desnaturação, emparelhamento e extensão com tempos e temperaturas exactas para cada passo e para a sequência dos primers utilizados. Para tal foi utilizado o termociclador 2720 Thermal Cycler da Applied Biosystems.

A preparação das misturas reaccionais foi realizada numa bancada limpa, com material livre de ácidos nucleicos, utilização de luvas e gelo durante todo o processo. As sequências de interesse (tabela suplementar 1) foram amplificadas de acordo com

as condições que se encontram na tabela suplementar 2. Antes de se iniciar a reacção de PCR, realizou-se uma desnaturação inicial, durante 2 minutos a 94°C.

A análise do polimorfismo genético da *CβS* foi efectuada a partir de PCR ²⁰⁶. No caso do polimorfismo da *MTHFR*, os produtos de PCR (fragmentos amplificados) foram posteriormente digeridos por uma enzima de restrição específica - PCR-RFLP (do inglês *Restriction fragment length polymorphism*) ⁸⁸. No que diz respeito à genotipagem dos indivíduos para o polimorfismo da *GSTT1* e *GSTM1*, a identificação da mesma foi feita em simultâneo – PCR-Multiplex, com a utilização de 5 primers específicos para as sequências de interesse. Para este caso foi utilizado um par de primers para o gene da enzima *GSTM4*, que como não apresenta polimorfismos, foi utilizado como controlo positivo ²⁰⁷.

3.7.2. Electroforese em gel de agarose

Os produtos de amplificação (tabela suplementar 3) foram separados por electroforese em gel de agarose (tina da Sigma modelo E1138 e gel de agarose da Lonza) em tampão TAE 1x. O gel foi corado com 5µL de brometo de etídio num volume de 50 mL de TAE 1x.

As imagens foram visualizadas num transiluminador sob luz UV (Genosmart, VWR).

Para a *MTHFR* realizou-se um gel de agarose (2%, 30 minutos, 100v) para a banda de amplificação (198pb) e, posteriormente, os produtos de amplificação foram digeridos numa reacção contendo 20µL de ADN amplificado, 0.5µL de enzima de restrição (Hinf I – 10U/µL) e 2µL tampão R+ (10x) (Thermo Scientific) durante 16h a 37°C.

O enzima Hinf I (Thermo Scientific) reconhece a sequência 5' G I ANTC 3' e no caso de existir substituição de C para T, o fragmento é cortado, sendo visualizados fragmentos de 175 e 23 pb. A metodologia utilizada para a separação dos diversos fragmentos encontra-se na tabela suplementar 3.

A análise dos resultados foi realizada utilizando um marcador molecular de 50 pb (Invitrogen) e um controlo negativo contendo 10µL de água desionizada (sem adição de ADN).

3.8. Análise Estatística

As frequências genótípicas observadas foram testados para o equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE) com o qui-quadrado. Este teste também foi utilizada para avaliar o significado estatístico da diferenças entre as frequências dos grupos de estudo com posterior análise do *odds ratio* (OR) e intervalos de confiança de 95% (IC 95%) obtidos apartir da regressão logística binária. Os grupos de estudo foram correlacionados entre si, nomeadamente, controlo *versus* DPRAD; controlo *versus* DRT; DPRAD *versus* DRT; controlos *versus* DMII, controlos *versus* DMII-DRT; DMII *versus* DMII-DRT.

Todas as variáveis contínuas foram testadas para a normalidade usando o teste de Kolmogorov-Smirnov. Em seguida, os testes paramétricos ou não-paramétricos foram devidamente utilizados para comparar as médias entre os grupos, nomeadamente ANOVA (com correção Bonferroni) ou Kruskal-Wallis e, para amostras independentes, T-teste ou Mann Whitney. A análise estatística foi realizada no programa SPSS 21.0 tendo os valores $p < 0.05$ considerados estatisticamente significativos.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. Caracterização da População

Os polimorfismos da *MTHFR*, da *CβS*, da *GSTT1/M1* e o fenótipo da *Hp* foram determinados nos seguintes grupos de indivíduos: controlos; DPRAD; diabetes *mellitus* tipo II (DMII) sem e com doença renal crónica (DMII-DRC); doença renal terminal (DRT).

A tabela 2 apresenta as características da amostra estudada no âmbito deste estudo retrospectivo e de associação caso-controlo.

Tabela 2: Características selecionadas da amostra estudada.

	Controlos N = 495	DPRAD N = 150	DMII N = 67	DMII-DRC N = 180	DRT N = 94
Sexo					
Feminino	270 (54.5)	80 (53.3)	29 (43.3)	96 (53.3)	38 (40.4)
Masculino	225 (45.5)	70 (46.7)	38 (56.7)	84 (46.7)	56 (59.6)
Idade	46.1±13.1	43.6±14.0	59.8±7.4	65.2±9.1	68.3±13.9
IMC	27.2±4.6	25.5±4.6	31.4±5.1	28.5±4.7	24.6±4.6
Baixo peso	2 (0.7)	2 (1.9)	0 (0.0)	1 (0.6)	6 (6.4)
Normoponderal	97 (33.3)	59 (55.7)	6 (12.5)	42 (25.8)	43 (45.7)
Excesso de peso	124 (76.6)	25 (23.6)	14 (29.2)	58 (35.6)	35 (37.2)
Obesidade	68 (23.4)	20 (18.9)	28 (58.3)	62 (38.0)	10 (10.6)
HTA	72 (24.8)	73 (70.2)	34 (75.6)	107 (77.5)	94 (100.0)
DRC					
Estadio 1	n.a.	79 (57.2)	n.a.	5 (2.8)	n.a.
Estadio 2	n.a.	14 (10.1)	n.a.	58 (32.2)	n.a.
Estadio 3	n.a.	21 (15.2)	n.a.	50 (27.8)	n.a.
Estadio 4	n.a.	18 (13.0)	n.a.	15 (8.3)	n.a.
Estadio 5	n.a.	6 (4.0)	n.a.	52 (28.9)	94 (100.0)
Creatinina	n.a.	1.6±1.5	1.0±0.4	1.6±1.1	n.a.
Cockcroft-Gault	n.a.	85.8±52.5	106.3±14.8	62.8±17.3	n.a.
Ferritina	n.a.	121.9±152.9	126.9±87.8	302.3±244.6	453.8±208.1
Ferro	n.a.	78.4±29.7	56.0±13.1	65.3±25.2	71.9±26.4
RMHb	22.2±8.2	22.8±5.8	22.1±4.3	22.6±7.2	22.9±6.9
FA	352.1±137.0	371.6±139.8	169.8±75.4	214.3±118.4	329.6±99.5
RTM	3.5±2.2	5.1±2.2	2.7	3.2±2.1	2.9±2.1

Idade (anos); IMC, índice de massa corporal (kg/m^2); HTA, hipertensão arterial; DRC, doença renal crónica; Creatinina (mg/dl); Cockcroft-Gault (ml/min); Ferritina ($\mu\text{g/dL}$); Ferro ($\mu\text{g/dL}$); RMHb, redutase da metahemoglobina ($\mu\text{mol/gHb/min}$); FA, fosfatase ácida ($\mu\text{mol/gHb/h}$); RTM, redutase transmembranar (mmolferricianeto/Lcélula/h); DPRAD, doença poliquística renal autossómica dominante; DMII, diabetes *mellitus* tipo II; DRT, doença renal terminal; n.a. não aplicável; IMC foi categorizado em baixo peso ($<18.5 \text{ kg/m}^2$); Peso normal ($18.5\text{--}24.9 \text{ kg/m}^2$); Excesso de peso ($25\text{--}29.9 \text{ kg/m}^2$); Obesidade ($>30 \text{ kg/m}^2$); Valores apresentados referem-se a médias±DP para as variáveis contínuas, e frequências absolutas (frequências relativas, %) para as variáveis qualitativas.

4.2. Genes Modificadores na Doença Poliquística Renal para Progressão para a Doença Renal Crónica

As tabelas 3 e 4 apresentam as frequências dos fenótipos / genótipos e respectivos alelos dos polimorfismos estudados tendo em conta a comparação entre os grupos considerados: [controles, DPRAD e DRT] (tabela 3) e [controles, DMII, DMII-DRC e DRT] (tabela 4).

Tabela 3: Distribuição dos fenótipos da *Hp* e dos genótipos da *GSTT1*, *GSTM1*, *MTHFR* e *CβS* em controles, em indivíduos com DPRAD e com DRT.

				<i>p</i>		
	Controlos (1)	DPRAD (2)	DRT (3)	(1) vs. (2)	(1) vs. (3)	(2) vs. (3)
<i>Hp</i>	<i>N</i> = 315	<i>N</i> = 135	<i>N</i> = 83			
1.1	48 (15.2)	25 (34.2)	12 (14.5)			
2.1	158 (50.2)	57 (42.2)	36 (43.4)	0.295	0.430	0.732
2.2	109 (34.6)	53 (39.3)	35 (42.2)			
Alelo 1	254 (40.0)	107 (39.6)	60 (36.1)			
Alelo 2	376 (60.0)	163 (60.4)	106 (63.9)	0.905	0.374	0.532
HW	<i>p</i> = 0.883	<i>p</i> = 0.598	<i>p</i> = 0.946			
<i>GSTT1</i>	<i>N</i> = 294	<i>N</i> = 71	<i>N</i> = 69			
Nulo	88 (29.9)	16 (22.5)	12 (17.4)	0.215	0.036	0.447
Não Nulo	206 (70.1)	55 (77.5)	57 (82.6)			
HW	<i>p</i> = n.a.	<i>p</i> = n.a.	<i>p</i> = n.a.			
<i>GSTM1</i>	<i>N</i> = 294	<i>N</i> = 69	<i>N</i> = 69			
Nulo	124 (42.2)	40 (58.0)	29 (42.0)	0.018	0.982	0.061
Não Nulo	170 (57.8)	29 (42.0)	40 (58.0)			
HW	<i>p</i> = n.a.	<i>p</i> = n.a.	<i>p</i> = n.a.			
<i>MTHFR</i>	<i>N</i> = 401	<i>N</i> = 71	<i>N</i> = 63			
TT	33 (8.29)	8 (11.3)	4 (6.3)			
TC	184 (45.9)	24 (33.8)	21 (33.3)	0.159	0.103	0.585
CC	184 (45.9)	39 (54.9)	38 (60.4)			
Alelo T	250 (31.2)	40 (28.2)	29 (23.0)	0.538	0.080	0.410
Alelo C	552 (68.8)	102 (71.8)	97 (77.0)			
HW	<i>p</i> = 0.606	<i>p</i> = 0.669	<i>p</i> = 0.918			
<i>CβS</i>	<i>N</i> = 211	<i>N</i> = 71	<i>N</i> = 61			
del/del	182 (86.3)	57 (80.3)	52 (85.2)			
ins/del	29 (13.7)	13 (18.3)	8 (13.1)	0.140	0.176	0.717
ins/ins	0 (0.0)	1 (1.4)	1 (1.7)			
Alelo del	393 (93.1)	127 (89.4)	112 (91.8)	0.216	0.764	0.657
Alelo ins	29 (6.9)	15 (10.6)	10 (8.2)			
HW	<i>p</i> = 0.584	<i>p</i> = 1.000	<i>p</i> = 0.589			

Os valores para os genótipos e respectivos alelos representam frequências absolutas (frequência relativa, %); *Hp*, Haptoglobina; *GSTT1*, glutatono s-transferase T1; *GSTM1*, glutatono s-transferase M1; *MTHFR*, metilenotetrahidrofolato redutase; *CβS*, cistationina β-sintetase; DPRAD, doença poliquística renal autossômica dominante; DRT, doença renal terminal; HW, equilíbrio de Hardy-Weinberg; n.a., não aplicável; vs., versus; *Hp* 1.1, *Hp* 1.1 versus *Hp* 2.1 e *Hp* 2.2; *Hp* 2.1, *Hp* 2.1 versus *Hp* 1.1 e *Hp* 2.2; *Hp* 2.2, *Hp* 2.2 versus *Hp* 1.1 e *Hp* 2.1; *MTHFR* TT, *MTHFR* TT versus *MTHFR* CT e *MTHFR* CC; *MTHFR* CT, *MTHFR* CT versus *MTHFR* CC e *MTHFR* TT; *MTHFR* CC, *MTHFR* CC versus *MTHFR* TT e *MTHFR* CT; *CβS* del/del, *CβS* del/del versus *CβS* ins/del e *CβS* ins/ins; *CβS* ins/del, *CβS* ins/del versus *CβS* del/del e *CβS* ins/ins; *CβS* ins/ins, *CβS* ins/ins versus *CβS* del/del e *CβS* ins/del; *p*, teste de qui quadrado; Valores significativos para *p* < 0.05.

Tabela 4: Distribuição dos fenótipos da Hp e dos genótipos da *GSTT1*, *GSTM1*, *MTHFR* e *CβS* em controles, em indivíduos com DMII, com DMII-DRC e com DRT.

					<i>p</i>				
	Controlo (1)	DMII (2)	DMII-DRC (3)	DRT (4)	(1) vs.(2)	(1) vs.(3)	(2) vs.(3)	(2) vs.(4)	(3) vs.(4)
Hp	<i>N</i> = 315	<i>N</i> = 57	<i>N</i> = 161	<i>N</i> = 83					
1.1	48 (15.2)	6 (10.5)	21 (13.0)	12 (14.5)					
2.1	158 (50.2)	25 (43.9)	92 (57.1)	36 (43.4)	0.254	0.353	0.096	0.779	0.104
2.2	109 (34.6)	26 (43.9)	48 (29.8)	35 (42.2)					
Alelo 1	254 (40.3)	37 (32.5)	134 (41.6)	60 (36.1)	0.139	0.752	0.107	0.610	0.284
Alelo 2	376 (59.7)	77 (67.5)	188 (58.4)	106 (63.9)					
HW	<i>p</i> = 0.883	<i>p</i> = 1.000	<i>p</i> = 0.269	<i>p</i> = 0.946					
GSTT1	<i>N</i> = 294	<i>N</i> = 57	<i>N</i> = 130	<i>N</i> = 69					
Nulo	88 (29.9)	16 (28.1)	37 (28.5)	12 (17.4)	0.778	0.759	0.956	0.151	0.084
Não Nulo	206 (70.1)	41 (71.9)	93 (71.5)	57 (82.6)					
HW	<i>p</i> = n.a.	<i>p</i> = n.a.	<i>p</i> = n.a.	<i>p</i> = n.a.					
GSTM1	<i>N</i> = 294	<i>N</i> = 57	<i>N</i> = 128	<i>N</i> = 69					
Nulo	124 (42.2)	22 (38.6)	62 (48.4)	29 (42.0)	0.616	0.234	0.215	0.696	0.389
Não Nulo	170 (57.8)	35 (61.4)	66 (51.6)	40 (58.0)					
HW	<i>p</i> = n.a.	<i>p</i> = n.a.	<i>p</i> = n.a.	<i>p</i> = n.a.					
MTHFR	<i>N</i> = 401	<i>N</i> = 60	<i>N</i> = 134	<i>N</i> = 63					
TT	33 (8.29)	1 (1.7)	16 (11.9)	4 (6.3)					
TC	184 (45.9)	33 (55.0)	60 (44.8)	21 (33.3)	0.132	0.430	0.052	0.036	0.073
CC	184 (45.9)	26 (43.3)	58 (43.3)	38 (60.4)					
Alelo T	250 (31.2)	35 (29.2)	92 (34.3)	29 (23.0)	0.736	0.377	0.376	0.340	0.031
Alelo C	552 (68.8)	85 (70.8)	176 (65.7)	97 (77.0)					
HW	<i>p</i> = 0.627	<i>p</i> = 0.132	<i>p</i> = 1.000	<i>p</i> = 0.918					
CBS	<i>N</i> = 211	<i>N</i> = 60	<i>N</i> = 134	<i>N</i> = 61					
ins/ins	182 (86.3)	40 (66.7)	103 (76.9)	52 (85.2)					
ins/del	29 (13.7)	20 (33.3)	31 (23.1)	8 (13.1)	0.001	0.025	0.136	0.021	0.097
Del/del	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (1.7)					
Alelo del	393 (93.1)	100 (83.3)	237 (88.4)	112 (91.8)	0.002	0.046	0.226	0.071	0.408
Alelo ins	29 (6.9)	20 (16.7)	31 (11.6)	10 (8.2)					
HW	<i>p</i> = 0.584	<i>p</i> = 0.319	<i>p</i> = 0.149	<i>p</i> = 0.589					

Os valores para os genótipos e respectivos alelos representam frequências absolutas (frequência relativa, %); *Hp*, Haptoglobina; *GSTT1*, glutathione s-transferase T1; *GSTM1*, glutathione s-transferase M1; *MTHFR*, metilenotetrahydrofolato redutase; *CβS*, cistationina β-sintetase; DMII, diabetes *mellitus* tipo 2; DRC, doença renal crônica; DRT, doença renal terminal; ; HW, equilíbrio de Hardy-Weinberg; n.a., não aplicável; vs., *versus*; *Hp* 1.1, *Hp* 1.1 *versus Hp* 2.1 e *Hp* 2.2; *Hp* 2.1, *Hp* 2.1 *versus Hp* 1.1 e *Hp* 2.2; *Hp* 2.2, *Hp* 2.2 *versus Hp* 1.1 e *Hp* 2.1; *MTHFR* TT, *MTHFR* TT *versus MTHFR* CT e *MTHFR* CC; *MTHFR* CT, *MTHFR* CT *versus MTHFR* CC e *MTHFR* TT; *MTHFR* CC, *MTHFR* CC *versus MTHFR* TT e *MTHFR* CT; *CβS* del/del, *CβS* del/del *versus CβS* ins/del e *CβS* ins/ins; *CβS* ins/del, *CβS* ins/del *versus CβS* del/del e *CβS* ins/ins; *CβS* ins/ins, *CβS* ins/ins *versus CβS* del/del e *CβS* ins/del; *p*, teste de qui quadrado; Valores significativos para *p* < 0.05.

4.2.1. Haptoglobina

O fenótipo da *Hp* foi determinado 751 indivíduos, sendo, 315 (41.9%) do grupo controle, 135 (18.0%) com DPRAD, 57 (7.6%) com DMII, 161 (21.4%) com DMII-DRC e 218 (29.1%) com DRT. No geral, o fenótipo *Hp* 2.1 foi o mais frequente (*Hp* 1.1: 112 (14.9%), *Hp* 2.1: 368 (49.0%) e *Hp* 2.2: 271 (36.1%). A distribuição dos fenótipos da *Hp* nos grupos estudados estavam em equilíbrio de HW (tabelas 3 e 4).

A tabela 5 apresenta a distribuição das frequências do fenótipo da *Hp* em indivíduos controles, com DPRAD, com DMII, com DMII-DRC e com DRT. Observou-se que não houve diferenças significativas na distribuição das frequências do fenótipo da *Hp*, comparando os controles com todos os outros grupos (tabela 5). Verificou-se uma tendência para a diferença entre a distribuição das frequências dos fenótipos da *Hp* nas amostras da DMII-DRC e DMII ($p = 0.096$), com o fenótipo *Hp* 2.1 mais frequente no grupo da DMII-DRC e *Hp* 2.2 na DMII (tabela 5). Neste grupo, o fenótipo heterozigótico apresentou uma tendência para risco na DMII-DRC (OR = 1.71 IC 95% [0.93-3.14], $p = 0.085$) (tabela 5). Por sua vez, a *Hp* 2.2 apresentou uma associação de proteção para o grupo de DMII-DRC (OR = 0.51, IC95% [0.27-0.94], $p = 0.032$) (tabela 5). Após ajuste, estas diferenças de distribuição foram perdidas (dados não apresentados).

O efeito oposto em relação ao risco e à proteção foi obtido nos indivíduos com DRT comparativamente à DMII-DRC (*Hp* 2.2: OR = 1.72, IC 95% [0.99-2.98], $p = 0.054$; *Hp* 2.1: OR = 0.57, IC 95 % [0.34-0.98], $p = 0.041$, respectivamente). Após ajuste para a idade o fenótipo *Hp* 2.1 manteve a associação de proteção e o fenótipo *Hp* 2.2 a tendência para o risco (dados não apresentados).

Relativamente à HTA, em indivíduos com DPRAD e após o ajuste para a idade, observou-se uma tendência de risco do fenótipo da *Hp* 1.1 em relação aos indivíduos hipertensos (OR= 5.31 IC 95% [0.90-31.28] $p = 0.065$) (dados não apresentados).

Para os restantes grupos estudados e para os diferentes estádios não se verificaram quaisquer diferenças significativas para o polimorfismo da *Hp* ($p > 0.05$) (dados não apresentados).

Tabela 5: Distribuição dos fenótipos da Haptoglobina nos grupos: controles, DPRAD, DMII (com e sem DRC) e DRT

OR [IC 95%]											
Hp	Controles (1) N = 315	DPRAD (2) N = 135	DMII (3) N = 57	DMII-DRC (4) N= 161	DRT (5) N = 83	(1) vs. (2)	p	(3) vs. (4)	p	(4) vs. (5)	p
1.1	48 (15.2)	25 (18.5)	6 (10.5)	14 (15.1)	12 (14.5)	1.35 [0.78-2.33]	0.278	1.28 [0.49-3.34]	0.620	1.13 [0.53-2.42]	0.760
2.1	158 (50.2)	57 (42.2)	25 (43.9)	50 (53.8)	36 (43.4)	0.73 [0.48-1.11]	0.135	1.71 [0.93-3.14]	0.084	0.57 [0.34-0.98]	0.041
2.2	109 (34.6)	53 (39.3)	26 (45.6)	29 (31.2)	35 (42.2)	1.17 [0.76-1.81]	0.469	0.51 [0.27-0.94]	0.030	1.72 [0.99-2.98]	0.054

Os valores para os genótipos representam frequências absolutas (frequência relativa, %); Hp, Haptoglobina; DPRAD, doença poliquística renal autossômica dominante; DMII, diabetes *mellitus* tipo 2; DRC, doença renal crônica; DRT, doença renal terminal; vs., versus; OR, odds ratio proveniente da regressão logística binária; IC, intervalo de confiança; Hp 1.1, Hp 1.1 versus Hp 2.1 e Hp 2.2; Hp 2.1, Hp 2.1 versus Hp 1.1 e Hp 2.2; Hp 2.2, Hp 2.2 versus Hp 1.1 e Hp 2.1; Valores significativos para $p < 0.05$.

4.2.2. *GSTT1/M1*

O genótipo da *GSTT1* foi determinado em 621 indivíduos, dos quais 294 (47.3%) controlos, 71 (11.4%) com DPRAD, 57 (9.2%) com DMII, 130 (20.9%) com DMII-DRC e 69 (11.1%) com DRT. O genótipo mais frequente, tendo em conta todas as amostras estudadas, no caso da *GSTT1* foi o não nulo ($N = 452$, 72.8%). No caso do genótipo da *GSTM1* foram avaliados 617 indivíduos, dos quais 294 (47.6%) controlos, 69 (11.2%) DPRAD, 57 (9.2%) com DMII, 128 (20.7%) com DMII-DRC e 69 (11.2%) com DRT. O genótipo mais frequente foi, também, o não nulo, com 340 indivíduos (55.1%). A distribuição dos genótipos da *GSTT1* e *GSTM1* nos grupos estudados estava em equilíbrio de HW.

A tabela 6 mostra a distribuição das frequências do genótipo da *GSTT1* nos controlos, em indivíduos com DPRAD e em indivíduos DRT. O genótipo *GSTT1* nulo esteve associado significativamente à protecção nos indivíduos com DRT em relação aos indivíduos controlo ($OR = 0.51$, IC 95% [0.30-0.99], $p = 0.044$) (tabela 6). Neste grupo verificaram-se diferenças significativas entre as distribuições dos genótipos da *GSTT1* ($p = 0.036$, tabela 3). O genótipo não nulo da *GSTT1*, apresentou uma associação de risco no mesmo grupo da DRT quando comparado com o controlo ($OR = 1.97$ IC 95% [1.01-3.86], $p = 0.044$) (tabela 6).

Quando comparámos a frequência do genótipo da *GSTT1*, nos indivíduos com e sem HTA na DPRAD, o genótipo nulo manteve a associação de protecção ($OR = 0.29$, IC 95% [0.08-1.04], $p = 0.051$) e o genótipo não nulo de risco ($OR = 3.40$, IC 95% [0.96-12.02], $p = 0.051$) (tabela 8).

No que diz respeito à distribuição das frequências do genótipo da *GSTM1*, verificaram-se diferenças significativas na distribuição dos genótipos entre controlos e indivíduos com DPRAD ($p = 0.018$, tabela 3). Esta diferença reflectiu-se, por um lado, protecção para os indivíduos com DPRAD com o genótipo não nulo *GSTM1* ($OR = 0.49$, IC 95% [0.28-0.84], $p = 0.009$) (tabela 7), e por outro, de risco para o genótipo nulo da *GSTM1* ($OR = 2.05$, IC 95% [1.19-3.54], $p = 0.009$) (tabela 7). Após ajuste para a idade, estes efeitos mantiveram-se significativos (tabela 7).

Em relação à HTA nos indivíduos com DPRAD, não se verificaram diferenças significativas para o polimorfismo da *GSTM1* (tabela 8). No entanto, o genótipo nulo da *GSTM1* foi mais frequente nos normotensos (tabela 8).

Para os restantes grupos estudados e para os diferentes estádios não se verificaram quaisquer diferenças significativas tanto para o polimorfismo da *GSTT1* como para a *GSTM1* ($p > 0.05$) (dados não apresentados).

Tabela 6: Distribuição dos genótipos do GSTT1 nos grupos: controles, DPRAD e DRT.

OR [IC 95%]					
GSTT1	Controles (1) N =294	DPRAD (2) N =71	DRT (3) N =69	(1) vs. (2)	p
Nulo	88 (29.9)	16 (22.5)	12 (17.4)	0.75 [0.41-1.38]	0.355
Não Nulo	206 (70.1)	55 (77.5)	57 (82.6)	1.34 [0.72-2.47]	0.355
				1.97 [1.01-3.86]	0.044

Os valores para os genótipos representam frequências absolutas (frequência relativa, %); GST, glutationo s-transferase; DPRAD, doença poliquística renal autossômica dominante; DRT,doença renal terminal; vs., versus; OR, odds ratio proveniente da regressão logística binária; IC, intervalo de confiança; Valores significativos para $p < 0.05$.

Tabela 7: Distribuição dos genótipos da GSTM1 nos grupos: controles e DPRAD.

OR [IC 95%]					
GSTM1	Controles (1) N =294	DPRAD (2) N = 69	(1) vs. (2)	p	p ^a
Nulo	124 (42.2)	40 (58.0)	2.05 [1.19-3.54]	0.009	2.10 [1.19-3.68]
Não Nulo	170 (57.8)	29 (42.0)	0.49 [0.28-0.84]	0.009	0.48 [0.27-0.84]

Os valores para os genótipos representam frequências absolutas (frequência relativa, %); GST, glutationo S-transferase; DPRAD, doença poliquística renal autossômica dominante; vs., versus; OR, odds ratio proveniente da regressão logística binária; OR ajustado, odds ratio proveniente da regressão logística binária ajustado para a idade; IC, intervalo de confiança; p^a, valor de p ajustado para a idade; Valores significativos para $p < 0.05$.

Tabela 8: Distribuição dos genótipos da GSTT1/M1 em indivíduos com DPRAD com e sem hipertensão arterial.

<i>GSTT1</i>	DPRAD		OR [IC 95%]			
	NT <i>N</i> = 17	HTA <i>N</i> = 41	OR	OR ajustado	<i>p</i>	<i>p</i> ^a
Nulo	7 (41.2)	7 (17.1)	0.29 [0.08-1.04]	0.52 [0.05-5.36]	0.051	0.579
Não Nulo	10(58.8)	34 (82.9)	3.40 [0.96-12.02]	1.94 [0.19-20.17]	0.051	0.579
<i>GSTM1</i>	<i>N</i> = 16	<i>N</i> = 40				
Nulo	12 (75.0)	20 (50.0)	0.33 [0.09-1.21]	0.83 [0.07-10.01]	0.095	0.881
Não Nulo	4 (25.0)	20 (50.0)	3.00 [0.83-10.90]	1.21 [0.10-14.74]	0.095	0.881

Os valores para os genótipos representam frequências absolutas (frequência relativa, %); *GST*, glutathione S-transferase; DPRAD, doença poliquística renal autossômica dominante; NT, normotenso; HTA, hipertensão arterial; vs., *versus*; OR, *odds ratio* proveniente da regressão logística binária; OR ajustado, *odds ratio* proveniente da regressão logística binária ajustado para a idade; IC, intervalo de confiança; *p*^a, valor de *p* ajustado para a idade; Valores significativos para *p* < 0.05.

4.2.3. *MTHFR* C677T (rs1801133)

O genótipo da *MTHFR* foi determinado 729 indivíduos, sendo 401 (55.0%) do grupo controlo, 71 (9.7%) DPRAD, 60 (8.2%) com DMII, 134 (18.4%) com DMII-DRC e 63 (8.6%) com DRT. No geral, o genótipo mais frequente da *MTHFR* foi o CC com 345 indivíduos (47.3%), seguido do CT (N = 322 , 44.2%) e o TT (N = 62, 8.5%). A distribuição dos genótipos da *MTHFR* nos grupos estudados estavam em equilíbrio de HW (tabelas 3 e 4).

Na tabela 9 encontram-se a distribuição das frequências dos genótipos da *MTHFR* nos controlos, em indivíduos com DMII-DRC e em indivíduos com DRT. Verifica-se que quando comparadas as distribuições das frequências do genótipo da *MTHFR* entre os indivíduos com DRT e os indivíduos controlo, o genótipo CT apresenta uma tendência para proteção (OR =0.60, IC 95% [0.34-1.06], $p = 0.062$) nos indivíduos com DRT, enquanto que o genótipo CC esteve significativamente associado a risco (OR = 1.80 IC 95% [1.05-3.10], $p = 0.033$) (tabela 9). Estes resultados perdem significado estatístico quando ajustado para a idade (dados não apresentados). O genótipo CC da *MTHFR* manteve o efeito de risco para a DRT, quando comparado com DMII-DRC (OR = 1.99, IC 95% [1.08-3.66], $p = 0.026$) (tabela 9). Após o ajuste para a idade o efeito no genótipo CC manteve-se (OR =2.02, IC 95% [1.04-3.93], $p = 0.037$) (dados não apresentados).

Quando se analisou a amostra de indivíduos com DMII, com e sem DRC, verificaram-se diferenças significativas entre a distribuições do genótipos da *MTHFR* ($p = 0.052$) (tabela 4). Na comparação entre estes grupos, o genótipo TT da *MTHFR* revelou-se de risco (OR = 8.00, IC 95% [1.04-61.79], $p = 0.046$) (tabela 10). Esta associação de risco do genótipo TT da *MTHFR* manteve-se significativa após ajuste para a idade (dados não apresentados). Na DMII e DRT, verificaram-se diferenças significativas entre os grupos ($p = 0.034$) (tabela 4), para proteção conferida pelo genótipo CT da *MTHFR* (OR = 0.41, IC 95% [0.20-0.85], $p = 0.016$) em favor dos indivíduos com DRT (tabela 10). Por outro lado, apesar de uma tendência, o genótipo CC da *MTHFR* esteve associado a risco (OR = 1.99, IC 95% [0.97-4.08], $p = 0.061$) nos indivíduos com DRT (tabela 10). Quando foi realizado o ajuste para a idade, estes efeitos não se observaram (dados não apresentados).

Quando se analisou a progressão dos indivíduos com DPRAD nos diferentes estadios da DRC em relação aos indivíduos da população controlo, não existiu significância na distribuição das frequências dos genótipos ($p = 0.145$). No entanto, o genótipo CT esteve significativamente associado a protecção dos indivíduos com DPRAD (OR =

0.64, IC 95% [0.41-1.00], $p = 0.050$) (tabela 11). A *MTHFR* TT apresenta associação de risco para DMII-DRC de estágio 4 ou 5 na DRC quando comparado com os indivíduos de DMII (tabela 11).

Para os restantes grupos estudados e para os diferentes estádios não se verificaram quaisquer diferenças significativas para o polimorfismo da *MTHFR* ($p > 0.05$) (dados não apresentados).

Tabela 9: Distribuição dos genótipos da *MTHFR* nos grupos: controles, DPRAD, DMII-DRC e DRT.

OR [IC 95%]									
<i>MTHFR</i>	Controles (1) N = 401	DPRAD (2) N = 71	DMII-DRC (3) N = 134	DRT (4) N = 63	(1) vs. (2)	p	(1) vs. (4)	p	(3) vs. (4)
TT	33 (8.2)	8 (11.3)	16 (11.9)	4 (6.3)	1.42 [0.63-3.21]	0.404	0.76 [0.26-2.22]	0.638	0.50 [0.16-1.56]
CT	184 (45.9)	24 (33.8)	60 (44.8)	21 (33.3)	0.60 [0.36-1.02]	0.060	0.60 [0.34-1.06]	0.062	0.62 [0.33-1.15]
CC	184 (45.9)	39 (54.9)	58 (43.3)	38 (60.4)	1.44 [0.87-2.39]	0.161	1.80 [1.05-3.10]	0.033	1.99 [1.08-3.66]

Os valores para os genótipos representam frequências absolutas (frequência relativa, %); *MTHFR*, metilenoetrahidrofolato redutase; DPRAD, doença poliquística renal autossômica dominante; DMII-DRC, diabetes *mellitus* tipo II com doença renal crônica; DRT, doença renal terminal; vs., versus; OR, odds ratio proveniente da regressão logística binária; IC, intervalo de confiança; *MTHFR* TT, *MTHFR* TT versus *MTHFR* CT e *MTHFR* CC; *MTHFR* CT, *MTHFR* CT versus *MTHFR* CC e *MTHFR* TT; *MTHFR* CC, *MTHFR* CC versus *MTHFR* TT e *MTHFR* CT; Valores significativos para $p < 0.05$.

Tabela 10: Distribuição dos genótipos da *MTHFR* nos grupos: DMII (com e sem DRC) e DRT

OR [IC 95%]						
<i>MTHFR</i>	DMII (1) N = 60	DMII-DRC (2) N = 134	DRT (3) N = 63	(1) vs. (2)	p	(1) vs. (3)
TT	1 (1.7)	16 (11.9)	4 (6.3)	8.00 [1.04-61.79]	0.046	4.00 [0.43-36.86]
CT	33 (55.0)	60 (44.8)	21 (33.3)	0.66 [0.36-1.22]	0.189	0.41 [0.20-0.85]
CC	26 (43.3)	58 (43.3)	38 (60.4)	1.00 [0.54-1.85]	0.995	1.99 [0.97-4.08]

Os valores para os genótipos representam frequências absolutas (frequência relativa, %); *MTHFR*, metilenoetrahidrofolato redutase; DMII, diabetes *mellitus* tipo II; DRC, doença renal crônica; DRT, doença renal terminal; vs., versus; OR, odds ratio proveniente da regressão logística binária; IC, intervalo de confiança; *MTHFR* TT, *MTHFR* TT versus *MTHFR* CT e *MTHFR* CC; *MTHFR* CT, *MTHFR* CT versus *MTHFR* CC e *MTHFR* TT; *MTHFR* CC, *MTHFR* CC versus *MTHFR* TT e *MTHFR* CT; Valores significativos para $p < 0.05$.

Tabela 11: Distribuição dos genótipos da *MTHFR* nos grupos: controlos, DPRAD com doença renal crónica, DMII e DMII-DRC nos estádios 4 e 5 da DRC.

OR [IC 95%]						
<i>MTHFR</i>	Controlos (1) <i>N</i> = 401	DPRAD Estadio 1 a 5 (2) <i>N</i> = 64	DMII (3) <i>N</i> = 60	DMII-DRC Estadio 4 + 5 (4) <i>N</i> = 39	(1) vs. (2) <i>p</i>	(3) vs. (4) <i>p</i>
TT	33 (8.2)	7 (10.9)	1 (1.7)	6 (15.4)	1.37 [0.58-3.24]	10.73 [1.24-92.97]
CT	184 (45.9)	21 (32.8)	33 (55.0)	16 (41.0)	0.64 [0.41-1.00]	0.57 [0.25-1.29]
CC	184 (45.9)	36 (56.3)	26 (43.3)	17 (43.6)	1.52 [0.89-2.58]	1.01 [0.45-2.28]

Os valores para os genótipos representam frequências absolutas (frequência relativa, %); *MTHFR*, metilenotetrahidrofolato redutase, DPRAD, doença poliquística renal autossômica dominante; DMII, diabetes mellitus tipo II; DRC, doença renal crónica; vs., versus; OR, odds ratio proveniente da regressão logística binária; IC, intervalo de confiança; *MTHFR* TT, *MTHFR* TT versus *MTHFR* CT e *MTHFR* CC; *MTHFR* CT, *MTHFR* CT versus *MTHFR* CC e *MTHFR* TT; *MTHFR* CC, *MTHFR* CC versus *MTHFR* TT e *MTHFR* CT; Valores significativos para *p* < 0.05.

4.2.4. C β S (SNP de inserção)

O genótipo da C β S foi determinado em 537 indivíduos, sendo ao genótipo del/del o mais frequente, com 434 indivíduos (80.8%), seguido do genótipo ins/del com 101 indivíduos (18.8%) e ins/ins 2 indivíduos (0.4%). Foram genotipados: 211 (39.3%) controlos, 71 (13.2%) com DPRAD, 60 (11.2%) com DMII, 134 (25.0) com DMII-DRC e 61 (11.4%) com DRT. A distribuição dos genótipos da C β S nos grupos estudados estavam em equilíbrio de HW (tabelas 3 e 4).

Quando se comparou a distribuição dos genótipos da C β S entre os controlos e indivíduos com DMII, verificou-se que as distribuições dos genótipos eram estatisticamente diferentes ($p = 0.001$) (tabela 4). Neste grupo, o genótipo del/del esteve associado significativamente a proteção nos indivíduos com DMII (OR = 0.33, IC 95% [0.17-0.64], $p = 0.001$), enquanto que o genótipo heterozigótico é associado ao risco (OR = 3.05, IC 95% [1.58-5.91], $p = 0.001$) (tabela 12). A significância estatística altera-se após ajuste para idade (dados não apresentados).

Na DRT em relação à DMII, verificaram-se diferenças significativas na distribuição dos genótipos da C β S ($p = 0.021$, tabela 4), com risco conferido pelo genótipo del/del e proteção para o genótipo ins/del, para os indivíduos com DRT (OR = 2.89, IC 95% [1.19-7.02], $p = 0.017$; OR = 0.30, IC 95% [0.12-0.76], $p = 0.008$, respectivamente) (tabela 12).

Na DRT, e após ajuste para a idade, verificou-se uma tendência de risco associado ao genótipo del/del da C β S, quando comparado com indivíduos com DMII-DRC (OR = 2.22, IC 95% [0.94-5.21], $p = 0.067$) (tabela 12). Por sua vez, o genótipo ins/del apresentou um efeito protetor (OR = 0.39, IC 95% [0.16-0.94], $p = 0.037$) (tabela 12). No entanto, nos indivíduos com DRT comparando com o grupo controlo, verificou-se efeitos opostos (del/del: OR = 0.55, IC 95% [0.31-0.95], $p = 0.031$ e ins/del: OR = 1.84, IC 95% [1.05-3.20], $p = 0.031$) (tabela 12).

Verificaram-se diferenças significativas na distribuição dos genótipos C β S entre os seguintes grupos: controlos *versus* DMII e controlos *versus* DMII-DRC (tabela 4). O genótipo del/del da C β S revelou-se protector na DMII-DRC (*versus* controlos) (OR= 0.53, IC 95% [0.30-0.93], $p = 0.025$), enquanto que o ins/del foi de risco para os indivíduos com DMII-DRC (OR = 1.89, IC 95% [1.08-3.31], $p = 0.025$) (tabela 13). Por outro lado, no que diz respeito à distribuição da C β S entre controlos e os indivíduos com DMII-DRC nos estadios mais avançado, observou-se que estes apresentaram o genótipo heterozigótico como risco (OR = 2.47, IC 95% [0.11-5.49], $p = 0.024$) e o

genótipo del/del da $C\beta S$ de proteção (OR = 0.41, IC 95% [0.18-0.93], $p = 0.024$) (tabela 13).

Para os restantes grupos estudados e para os diferentes estádios não se verificaram quaisquer diferenças significativas tanto para o polimorfismo $C\beta S$ ($p > 0.05$) (dados não apresentados).

Tabela 12: Distribuição dos genótipos da CβS nos grupo: controles, DPRAD, DMII (com e sem DRC) e DRT.

OR [IC 95%]													
CβS	Controlo (1) N = 211	DPRAD (2) N = 71	DMII (3) N = 60	DMII-DRC (4) N = 134	DRT (5) N = 61	(1) vs. (2)	p	(1) vs. (3)	p	(3) vs. (5)	p	(4) vs. (5)	p ^a
<i>del/del</i>	182 (86.3)	57 (80.3)	40 (66.7)	103 (76.9)	52 (85.2)	0.65 [0.32-1.31]	0.228	0.33 [0.17-0.64]	0.001	2.89 [1.19-7.02]	0.017	2.22 [0.94-5.21]	0.067
<i>Ins/del</i>	29 (13.7)	13 (18.3)	20 (33.3)	31 (23.1)	8 (13.1)	1.41 [0.69-2.88]	0.352	3.05 [1.58-5.91]	0.001	0.30 [0.12-0.76]	0.008	0.39 [0.16-0.94]	0.037
<i>Ins/ins</i>	0 (0.0)	1 (1.4)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (1.7)	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.

Os valores para os genótipos representam frequências absolutas (frequência relativa, %); CβS; cistationina β-sintase; DPRAD, doença poliquística renal autossômica dominante; DMII, diabetes *mellitus* tipo 2; DRC, doença renal crônica; DRT, doença renal terminal; vs., *versus*; OR, *odds ratio* proveniente da regressão logística binária; IC, intervalo de confiança; OR ajustado, *odds ratio* proveniente da regressão logística binária ajustado para a idade; IC, intervalo de confiança p^a, valores ajustados para a idade; CβS del/del, CβS del/del *versus* CβS ins/ins; CβS ins/del, CβS ins/del *versus* CβS del/del e CβS ins/ins; CβS ins/ins *versus* CβS del/del e CβS ins/del; Valores significativos para p < 0.05.

Tabela 13: Distribuição dos genótipos da CβS nos grupos: controles, DMII-DRC e DMII-DRC nos estádios 4 e 5 da DRC.

OR [IC 95%]							
CβS	Controlo (1) N = 211	DMII-DRC (2) N = 134	DMII-DRC Estadio 4 +5 (3) N = 39	(1) vs. (2)	p	(1) vs. (3)	p
del/del	182 (86.3)	103 (76.9)	28 (71.8)	0.53 [0.30-0.93]	0.025	0.41 [0.18-0.93]	0.024
Ins/del	29 (13.7)	31 (23.1)	11 (28.2)	1.89 [1.08-3.31]	0.025	2.47 [0.11-5.49]	0.024
Ins/Ins	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.

Os valores para os genótipos representam frequências absolutas (frequência relativa, %); CβS, cistationina β-sintase; DMII-DRC, diabetes *mellitus* tipo 2 com doença renal crônica; vs., *versus*; OR, *odds ratio* proveniente da regressão logística binária; IC, intervalo de confiança; CβS del/del, CβS del/del *versus* CβS ins/del e CβS ins/ins; CβS ins/del, CβS ins/del *versus* CβS del/del e CβS ins/ins; CβS ins/ins, CβS ins/ins *versus* CβS del/del e CβS ins/del; Valores significativos para p < 0.05.

Relativamente à progressão para a doença renal crónica no que respeita à equação de Cockcroft-Gault e ao declive de creatinina, observaram-se diferenças estatisticamente significativas na distribuição da *Hp* nos indivíduos classificados como progressores lentos, moderados ou rápidos para o declive da creatinina ($p = 0.009$), sendo a *Hp* 2.1 mais frequente nos dois primeiros e a *Hp* 2.2. no último (dados não apresentados). Relativamente à depuração da creatinina verifica-se que o fenótipo da *Hp* 2.1 foi de protecção para os indivíduos com progressão rápida em relação aos com uma progressão lenta (OR = 0.22 IC 95% [0.06-0.82], $p = 0.018$) (tabela 14), esta significância e efeito mantiveram-se após o ajuste para a idade (OR = 0.21 IC 95% [0.046-0.93], $p = 0.039$). No fenótipo homozigótico do alelo 2 da *Hp*, observou-se uma tendência para o risco nos indivíduos com progressão rápida em relação aos de progressão lenta (OR = 2.59 [0.86-7.80], $p = 0.087$). Esta tendência de associação é perdida após o ajuste para a idade (tabela 14).

No polimorfismo da *GSTM1* e quando se considerou os valores da equação de Cockcroft, o risco surge associado ao genótipo não nulo nos progressores rápidos (OR= 5.50 [1.32-22.86], $p = 0.019$) e o protector associado ao nulo (OR= 0.18 [0.04-0.76], $p = 0.019$) (tabela 14). Estas associações foram perdidas após ajuste para a idade (tabela 14).

Na distribuição das frequências do genótipo da *CβS* nos progressores lentos e rápidos para o declive da creatinina sérica nos indivíduos com DPRAD, e após ajuste para a idade, observaram-se diferenças significativas com o genótipo del/del de risco (OR = 14.63, IC 95% [1.02-209.47], $p = 0.048$). O genótipo ins/del surge como protector (tendência) também após o ajuste para a idade (OR = 0.07, IC 95% [0.01-1.16], $p = 0.064$) (tabela 14).

No polimorfismo da *MTHFR* não se verificaram diferenças significativas relativamente à progressão avaliada segundo a equação de Cockcroft-Gault e o declive de creatinina ($p > 0.05$) (tabela 14).

Tabela 14: Distribuição dos fenótipos da haptoglobina e dos genótipos da GSTT1, GSTM1, MTHFR e CβS em indivíduos com DPRAD com progressão lenta ou rápida segundo a equação de Cockcroft-Gault e o declive de creatinina

Delta Cockcroft-Gault, progressores				Declive Creatinina, progressores				OR [IC 95%]				OR ajustado [IC 95%]							
		Lentos (1) Rápidos (2) Lentos (3) Rápidos (4)		(1) vs. (2)		p		(3) vs. (4)		p		(1) vs. (2)		p ^a		(3) vs. (4)		p ^a	
N =		29		26		28		29											
Hp	1.1	7 (24.1)	8 (30.8)	7 (25.0)	7 (24.1)	0.96 [0.29-3.19]	0.940	1.40 [0.43-4.59]	0.581	3.59 [0.50-25.77]	0.204	2.54 [0.60-10.89]	0.208						
	2.1	13 (44.8)	4 (15.4)	12 (42.9)	7 (24.1)	0.42 [0.14-1.32]	0.134	0.22 [0.06-0.82]	0.018	0.36 [0.07-1.96]	0.236	0.21 [0.46-0.93]	0.039						
	2.2	9(31.0)	14 (53.8)	9 (32.1)	15 (51.8)	2.26 [0.77-6.64]	0.134	2.59 [0.86-7.80]	0.087	1.08 [0.22-5.24]	0.923	1.76 [0.50-6.15]	0.379						
N =		21		20		19		19											
GSTT1	Nulo	6 (28.6)	3 (15.0)	2 (10.5)	6 (31.6)	0.44 [0.09-2.08]	0.301	3.92 [0.68-22.71]	0.127	0.72 [0.03-16.68]	0.836	8.39 [0.90-78.00]	0.061						
	Não Nulo	15 (71.4)	17 (85.0)	17 (89.5)	13 (68.4)	2.27[0.48-10.68]	0.301	0.26 [0.04-1.48]	0.127	1.39 [0.06-32.42]	0.836	0.12 [0.01-1.11]	0.061						
N =		20		19		19		19											
GSTM1	Nulo	16 (80.0)	8 (42.1)	14 (73.7)	10 (58.8)	0.18 [0.04-0.76]	0.019	0.51 [0.13-2.08]	0.348	0.15 [0.01-2.33]	0.175	0.63 [0.12-3.37]	0.584						
	Não Nulo	4 (20.0)	11 (57.9)	5 (26.3)	7 (41.2)	5.50 [1.32-22.86]	0.019	1.96[0.48-7.99]	0.348	6.76 [0.43-106.5]	0.175	1.60 [0.30-8.63]	0.584						
N =		21		20		19		19											
MTHFR	TT	3 (14.3)	1 (5.0)	1 (5.3)	2 (10.5)	0.32 [0.03-3.32]	0.337	2.12 [0.18-25.55]	0.555	0.32 [0.01-17.00]	0.575	1.77 [0.12-27.22]	0.682						
	CT	5 (23.8)	8 (40.0)	5 (26.3)	7 (36.8)	2.13 [0.56-8.19]	0.269	1.63 [0.41-6.51]	0.487	5.12 [0.31-83.40]	0.251	3.18 [0.55-18.37]	0.196						
	CC	13 (61.9)	11(55.0)	13 (68.4)	10 (52.6)	0.75 [0.22-2.61]	0.654	0.51 [0.14-1.92]	0.322	0.43 [0.04-4.62]	0.487	0.30 [0.06-1.54]	0.148						
N =		20		20		19		19											
CpS	del/del	17 (85.0)	16 (80.0)	15 (78.9)	17 (89.5)	0.71 [0.14-3.66]	0.677	2.27 [0.36-14.19]	0.374	1.91 [0.11-32.05]	0.652	14.63 [1.02-209.47]	0.048						
	Ins/del	2 (10.0)	4 (20.0)	3 (15.8)	2 (10.5)	2.25 [0.36-13.97]	0.376	0.63 [0.09-4.26]	0.631	0.66 [0.03-13.18]	0.783	0.07 [0.01-1.16]	0.064						
	Ins/Ins	1 (5.0)	0 (0.0)	1 (5.3)	0 (0.0)	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.					

4.3. Fenótipo Intermédio

Foram analisados alguns parâmetros antropométricos e bioquímicos nos seguintes grupos de indivíduos: DPRAD, DMII, DMII-DRC e DRT. De acordo com os resultados expostos nas seções anteriores procedeu-se à comparação desses parâmetros tendo em conta os seguintes grupos: DPRAD *versus* DRT, DPRAD *versus* DMII e DPRAD *versus* DMII-DRC (tabela 15).

No geral, verificaram-se diferenças significativas na idade para os grupos analisados ($p < 0.001$), sendo os indivíduos com DPRAD mais novos, enquanto, que os indivíduos com DRT apresentaram idades superiores (tabela 15).

Na avaliação da composição corporal, observaram-se diferenças significativas no IMC nos seguintes grupos DPRAD *versus* DMII ($p < 0.001$) e DPRAD *versus* DMII-DRC ($p < 0.001$). Em todos os grupos, à exceção da DRT ($\text{IMC} = 24.9 \pm 4.6 \text{ Kg/m}^2$), observou-se excesso de peso ou obesidade ($\text{IMC} > 25.0 \text{ Kg/m}^2$) e de referir que os indivíduos com DMII tinham obesidade ($\text{IMC} = 31.4 \pm 5.1 \text{ Kg/m}^2$) (tabela 15).

A distribuição do género foi igual em todos os grupos ($p > 0.05$).

No que concerne aos valores de creatinina, apenas se observou diferenças significativas com valores inferiores no grupo DPRAD (*versus* DMII-DRC) ($p = 0.004$). Segundo a fórmula de Cockcroft-Gault observaram-se diferenças significativas, em que para o grupo DPRAD *versus* DMII os valores foram mais elevados na DMII ($106.3 \pm 14.8 \text{ ml/min}$, $p < 0.001$) e no grupo DPRAD *versus* DMII-DRC foram os indivíduos com DMII-DRC que apresentaram valores mais elevados ($85.7 \pm 5.0 [10.9-250.4] \text{ ml/min}$, $p < 0.001$) (tabela 15).

Os indivíduos com DMII-DRC apresentam significativamente valores mais baixos de ferritina do que os indivíduos com DRT ($p < 0.001$) e para o grupo DPRAD *versus* DMII-DRC esse padrão observou-se nos indivíduos com DPRAD ($p < 0.001$) (tabela 15).

Para os níveis de ferro, os indivíduos com DPRAD apresentaram valores mais elevadas em todos os grupos, apesar de só se terem observado diferenças significativas no grupo DPRAD *versus* DMII-DRC ($p = 0.006$) (tabela 15).

Para os parâmetros relacionados com o glóbulo vermelho, tanto a atividade da FA como da RTM estiveram significativamente mais elevadas nos indivíduos com DPRAD, em todos os grupos analisados ($p < 0.05$) (tabela 15).

Tabela 15: Características antropométricas e bioquímicas para os grupos DPRAD versus DRT, DMII e DMII-DRC

	DPRAD versus. DRT	p.	DPRAD versus. DMII	p.	DPRAD versus. DMII-DRC	p.
Idade (anos)	(122) 43.6±14.0 vs. (94) 68.3±13.9	<0.001	(122) 42.0±1.3 [19.0-74.0] vs. (45) 60.0±1.01 [42.0-75.0]	<0.001	(122) 42.0±1.3 [19.0-74.0] vs. (139) 66.0±0.8 [15.0-88.0]	<0.001
IMC (kg/m ²)	(106) 25.5±4.6 vs. (94) 24.6±4.6	0.141	(106) 25.5±4.6 vs. (48) 31.4±5.1	<0.001	(106) 25.5±4.6 vs. (163) 28.5±4.7	<0.001
Género (F/M)	38 (40.4) / 56 (59.6) vs. 80 (53.3) / 70 (46.7)	0.065	80 (53.3) / 70 (46.7) vs. 29 (43.3) / 38 (56.7)	0.171	80 (53.3) / 70 (46.7) vs. 96 (53.3) / 84 (46.7)	1.000
Creatinina (mg/dl)	(138) 1.0±0.1 [0.5-9.5] vs. (-)	n.a.	(138) 1.0±0.1 [0.5-9.5] vs. (39) 0.9±0.1 [0.6-2.5]	0.094	(138) 1.0±0.1 [0.5-9.5] vs. (137) 1.2±0.1 [0.6-7.6]	0.004
Cockcroft-Gault	(109) 85.8±52.5 vs. (-)	n.a.	(109) 85.8±52.5 vs. (35) 106.3±14.8	<0.001	(109) 85.7± 5.0 [10.9-250.4] vs. (96) 63.0±1.8 [13.6-89.9]	0.003
Ferritina (µg/L)	(111) 89.9±14.6 [4.2-1221.0] vs. (61) 431.0±26.6 [70-1080]	<0.001	(111) 89.9± 14.6 [4.2-1221.0] vs. (3) 110.0±50.7 [48.8-222.0]	0.503	(111) 89.9± 14.6 [4.2-1221.0] vs (53) 272.0±33.6 [11.1-971.0]	<0.001
Ferro (µg/dL)	(117) 78.4±29.7 vs. (61) 71.9±26.4	0.153	(117) 78.4±29.7 vs. (3) 56.0±13.1	0.198	(117) 78.4±29.7 vs. (53) 65.3±25.2	0.006
FA (µmol/gHb/h)	(131) 371.6±139.8 vs. (76) 329.6±99.5	0.013	(131) 371.6±139.8 vs. (53) 169.8±75.5	<0.001	(131) 373.8±12.2 [56.7-752.3] vs. (48) 172.2±9.7 [58.7-719.3]	<0.001
RTM (mmolferricianeto/Lcélula/h)	(110) 5.3±2.5 vs. (75) 2.9±2.1	<0.001	(110) 5.3±2.5 vs. (1) 2.7	n.a.	(110) 5.3±2.5 vs. (46) 3.7±3.3	0.002

IMC, índice de massa corporal; FA, fosfatase ácida; RTM, redutasetransmembranar; DPRAD, doença poliquística renal autossômica dominante; DRT, doença renal terminal; DMII, diabetes *mellitus* tipo II; DRC, doença renal crônica; n.a. não aplicável; vs., versus; ;. Valores apresentados referem-se a médias±DP para as variáveis contínuas, median±DP[mínimo-máximo] para variáveis não contínuas e frequências absolutas para as variáveis qualitativas. Valores significativos para $p < 0.05$.

4.4. Relações Genótipo-fenótipo-bioquímico Envolvidos na Progressão para a Doença Renal Crónica

De acordo com a análise do papel dos genes modificadores e de alguns parâmetros bioquímicos, descritos anteriormente, com vista a perceber progressão para a DRC nos indivíduos com DPRAD, foi analisada a relação do perfil genético com os fenótipos mais distantes.

4.4.1. Haptoglobina

No que concerne aos fenótipos da *Hp*, e comparando as médias dos parâmetros bioquímicos entre estes fenótipos, observaram-se valores significativamente mais elevados de IMC e FA, nos indivíduos com DMII-DRC com os fenótipos *Hp* 2.1 e *Hp* 2.2, respectivamente (IMC, kg/m²: (*Hp* 2.1, N = 84) 29.5±4.9 *versus* (*Hp* 2.2, N = 46) 27.3±4.5, *p* = 0.013; FA, µmol/gHb/h: (*Hp* 2.1, N = 74) 174.4±91.0 *versus* (*Hp* 2.2, N = 44) 239.5±119.6, *p* = 0.013) (dados não apresentados). Por outro lado, os indivíduos com DRT e fenótipo *Hp* 1.1 apresentaram valores significativamente mais elevados de ferro (ferro, µg/dL: (*Hp* 1.1, N = 12) 88.3±27.6 *versus* (*Hp* 2.2, N = 24) 64.7±19.2, *p* = 0.037) (dados não apresentados).

Na comparação dos parâmetros estudados para os indivíduos pertencentes aos grupos considerados (grupo 1: DPRAD *versus* DMII, grupo 2: DPRAD *versus* DMII-DRC e grupo 3: DPRAD *versus* DRT), verificaram-se diferenças significativas em todos os grupos, em que os indivíduos com o fenótipo *Hp* 1.1 apresentaram valores mais elevados da atividade da FA (µmol/gHb/h). Grupo 1: (*Hp* 1.1, N = 27) 377.1±178.6, (*Hp* 2.1, N = 75) 294.0±144.2, (*Hp* 2.2, N = 70) 283.7±138.3, *p* = 0.018; grupo 2: (*Hp* 1.1, N = 38) 334.0±175.7, (*Hp* 2.1, N = 126) 248.6±138.8, (*Hp* 2.2, N = 93) 292.1±132.6, *p* = 0.003; grupo 3: (*Hp* 1.1, N = 33) 407.8±135.2, (*Hp* 2.1, N = 83) 118.4±13.0, (*Hp* 2.2, N = 81) 337.1±119.8, *p* = 0.012 (dados não apresentados).

Os indivíduos com DPRAD (*versus* DMII ou *versus* DMII-DRC) apresentaram valores significativamente mais elevados da atividade da FA, tendo-se verificado valores mais elevados para os indivíduos DPRAD com fenótipo *Hp* 1.1 em ambos os grupos 1 e 2 (tabela 16.2).

Os indivíduos com DMII-DRC e com fenótipo *Hp* 2.1 tiveram valores elevados de IMC. Ainda em relação à comparação de algumas características antropométricas e parâmetros bioquímicos por fenótipos da *Hp* nos grupos analisados, verificou-se que a

idade esteve significativamente diferente em todos os grupos, independentemente dos fenótipos da *Hp* (tabela 16.1). Por outro lado, os valores IMC nos indivíduos com DMII-DRC e fenótipo *Hp* 2.1 mantiveram-se elevados quando comparados com os indivíduos com DPRAD e com fenótipo *Hp* 2.1 (tabela 16.1). Neste grupo (2), os indivíduos com DMII-DRC e com fenótipo *Hp* 2.2, apresentaram valores significativamente mais elevados de IMC (DPRAD, N = 37: $25.6 \pm 5.0 \text{ kg/m}^2$ *versus* DMII-DRC, N = 46: $27.3 \pm 4.5 \text{ kg/m}^2$, $p < 0.001$) (tabela 16.1). No grupo 1, os indivíduos com DMII apresentaram valores de IMC significativamente mais elevados, independentemente dos fenótipos da *Hp* (tabela 16.1). Por outro lado, no grupo 3, os indivíduos com DPRAD e fenótipo *Hp* 2.1 apresentaram valores significativamente mais elevados de IMC (DPRAD, N = 43: $25.2 \pm 4.3 \text{ kg/m}^2$ *versus* DRT, N = 36: $23.3 \pm 4.1 \text{ kg/m}^2$, $p = 0.043$) (tabela 16.1).

Os valores elevados de ferro, descritos anteriormente, nos indivíduos com DRT e fenótipo *Hp* 1.1, perdem significância estatística no grupo referente, ou seja, DPRAD *versus* DRT ($p = 0.392$), tendo apenas se observado valores significativamente mais elevados para os indivíduos com DPRAD e fenótipo *Hp* 2.2 (DPRAD, N = 42: $81.1 \pm 28.3 \mu\text{g/dL}$ *versus* DRT, N = 24: $64.7 \pm 19.2 \mu\text{g/dL}$, $p = 0.014$) (tabela 16.2). Os indivíduos com DPRAD e fenótipo *Hp* 2.1 também apresentaram valores significativamente mais elevados de ferro em relação aos indivíduos com DMII-DRC (DPRAD, N = 46: $73.9 \pm 30. \mu\text{g/dL}$ *versus* DMII-DRC, N = 18: $57.9 \pm 15.3 \mu\text{g/dL}$, $p = 0.007$) (tabela 16.2).

Em relação a outro parâmetro do metabolismo do ferro, a ferritina e para o fenótipo da *Hp* verificou-se que no grupo 3, os indivíduos com DRT apresentaram valores significativamente elevados, independentemente dos fenótipos da *Hp* (tabela 16.2). Por outro lado, no grupo 2, os indivíduos com DMII-DRC e fenótipos *Hp* 1.1 ou *Hp* 2.2, apresentaram valores significativamente mais elevados de ferritina (tabela 16.2).

Nos parâmetros envolvidos na doença renal crónica, como a creatinina e o Cockcroft-Gault, e para os portadores do fenótipo *Hp* 2.1, observou-se uma relação inversa na expressão destes parâmetros, com valores mais elevados de creatinina nos indivíduos com DMII-DRC e mais elevados de Cockcroft-Gault nos indivíduos com DPRAD (tabela 16.1).

Na RTM, os indivíduos com DPRAD e com fenótipos *Hp* 2.1 e *Hp* 2.2, apresentaram valores significativamente mais elevados em relação aos indivíduos com DMII-DRC (grupo 2) e DRT (grupo 3) (tabela 16.2).

4.4.2. *GSTT1*

Os indivíduos pertencentes ao grupo 3 e com genótipo não nulo da *GSTT1* apresentaram idades significativamente mais elevadas (*GSTT1* nulo, N = 28) 50.0 ± 19.2 anos *versus* (*GSTT1* não nulo, N = 105) 59.6 ± 18.0 anos, $p = 0.014$) (dados não apresentados). No entanto, nos grupos analisados (DPRAD *versus* DMII, DPRAD *versus* DMII-DRC, DPRAD *versus* DRT), a idade foi significativamente mais elevada nos indivíduos com DMII, DMII-DRT e DRT, independentemente dos genótipos *GSTT1* (tabela 16.1).

Nas características antropométricas analisadas, os indivíduos com DMII e DMII-DRC (*versus* DPRAD) apresentaram valores de IMC significativamente mais elevados independentemente dos genótipos da *GSTT1* (tabela 16.1).

Na creatinina, apenas se verificaram valores significativamente mais elevados nos indivíduos com DPRAD e com genótipo não nulo da *GSTT1* em relação aos indivíduos com DMII (tabela 16.1). Para o Cockcroft-Gault, os indivíduos com DPRAD e genótipo não nulo da *GSTT1* apresentaram valores significativamente mais baixos em relação aos indivíduos com DMII (tabela 16.1); e no grupo 2, os indivíduos com DPRAD e genótipo nulo da *GSTT1* apresentaram valores significativamente mais elevados em relação aos indivíduos com DMII-DRC (tabela 16.1).

Nos parâmetros relacionados com o metabolismo do ferro, apenas a ferritina esteve significativamente mais elevada nos indivíduos com DRT e DMII-DRC (*versus* DPRAD), independentemente, dos genótipos da *GSTT1* (tabela 16.2).

No que concerne os parâmetros relacionados com o glóbulo vermelho, observaram-se valores significativamente mais elevados da atividade da FA nos indivíduos com DPRAD (*versus* DMII ou *versus* DMII-DRC), independentemente dos genótipos da *GSTT1*, ao passo que nos indivíduos com DPRAD, em relação aos indivíduos com DRT, apenas se verificaram valores da atividade da FA significativamente mais elevados no genótipo não nulo da *GSTT1* (tabela 16.2). Na RTM, os indivíduos com DPRAD apresentaram valores significativamente mais elevados, tendo no grupo 3 sido independente dos genótipos da *GSTT1* e no grupo 2, significativo no genótipo não nulo da *GSTT1* (tabela 16.2).

4.4.3. *GSTM1*

Os indivíduos com DPRAD e genótipo nulo da *GSTM1* apresentaram valores significativamente mais elevados da RTM em relação ao genótipo não nulo (RTM, mmolferricianeto/Lcélula/h: (*GSTM1* nulo, N = 26) 6.3 ± 2.1 versus (*GSTM1* não nulo, N = 21) 5.1 ± 2.0 , $p = 0.052$) (dados não apresentados). Os valores significativamente elevados da RTM nos indivíduos portadores do genótipo nulo da *GSTM1* manteve-se nos indivíduos pertencentes ao grupo 2 (*GSTM1* nulo, N = 41) 5.3 ± 2.5 mmolferricianeto/Lcélula/h versus (*GSTM1* não nulo, N = 37) 4.2 ± 2.2 mmolferricianeto/Lcélula/h, $p = 0.045$) (dados não apresentados).

No entanto, os indivíduos com DPRAD (versus DMII-DRC ou versus DRT) apresentaram valores significativamente mais elevados da atividade da RTM, independentemente dos genótipos da *GSTM1* (tabela 17.2).

Os indivíduos pertencentes ao grupo 3 e com genótipo não nulo da *GSTM1* apresentaram idades significativamente mais elevadas (*GSTM1* nulo, N = 66) 54.0 ± 19.0 anos versus (*GSTM1* não nulo, N = 65) 62.0 ± 17.0 anos, $p = 0.012$) (dados não apresentados). No entanto, nos grupos analisados (DPRAD versus DRT, DPRAD versus DMII e DPRAD versus DMII-DRC), a idade foi significativamente mais elevada nos indivíduos com DMII, DMII-DRT e DRT, independentemente dos genótipos *GSTM1* (tabela 16.1).

No IMC, verificou-se que os indivíduos pertencentes ao grupo 2 apresentaram valores significativamente mais elevados, particularmente os indivíduos portadores do genótipo não nulo da *GSTM1*; Grupo 1: (*GSTM1* nulo, N = 45) $27.1 \pm 5.6 \text{ kg/m}^2$ versus (*GSTM1* não nulo, N = 45) $29.7 \pm 5.5 \text{ kg/m}^2$, $p = 0.030$; grupo 2: (*GSTM1* nulo, N = 84) $26.7 \pm 4.9 \text{ kg/m}^2$ versus (*GSTM1* não nulo, N = 84) $28.8 \pm 5.0 \text{ kg/m}^2$, $p = 0.009$ (dados não apresentados). Este padrão do IMC no polimorfismo da *GSTM1*, no entanto, revelou-se independente dos genótipos no grupo 1, com valores de IMC significativamente mais elevados nos indivíduos com DMII (tabela 17.1). No grupo 2, os indivíduos com DPRAD portadores do genótipo nulo da *GSTM1* apresentaram valores significativamente mais reduzidos de IMC, ao passo que, no grupo 3, os indivíduos com DPRAD com genótipo não nulo da *GSTM1* apresentaram valores de IMC significativamente mais elevados (tabela 17.1).

Relativamente, a outros parâmetros bioquímicos, como a creatinina, apenas se verificaram valores significativamente mais elevados nos indivíduos com DPRAD e com genótipo não nulo da *GSTM1* em relação aos indivíduos com DMII (tabela 17.1).

Para a fórmula de Cockcroft-Gault, os indivíduos com DPRAD e genótipo não nulo da *GSTM1* apresentaram valores significativamente mais baixos em relação aos indivíduos com DMII (tabela 17.1); e no grupo 3, os indivíduos com DPRAD e genótipo nulo da *GSTM1* apresentaram valores significativamente mais elevados em relação aos indivíduos com DMII-DRC (tabela 17.1).

Nos parâmetros relacionados com o metabolismo do ferro, apenas a ferritina esteve significativamente mais elevada nos indivíduos com DMII-DRC e DRT (*versus* DPRAD), independentemente dos genótipos da *GSTM1* (tabela 17.2).

Por fim, na atividade da FA, os indivíduos com DPRAD apresentaram valores significativamente mais elevados, tendo sido independente dos genótipos da *GSTM1* quando comparado com indivíduos com DMII ou DMII-DRC (tabela 17.2). No grupo 3, observaram-se valores significativamente mais elevados da atividade da FA nos indivíduos com DPRAD e com genótipo não nulo (*versus* DRT) (tabela 17.2).

4.4.3. *MTHFR*

Para a *MTHFR*, os indivíduos com DMII-DRC portadores do genótipo CC apresentaram valores de IMC mais elevados, próximos da significância, em relação aos outros genótipos (*MTHFR* TT, N = 14) $26.9 \pm 2.8 \text{ kg/m}^2$ *versus* (*MTHFR* CT, N = 57) $28.4 \pm 5.4 \text{ kg/m}^2$ e (*MTHFR* CC, N = 54) $30.0 \pm 4.2 \text{ kg/m}^2$, $p = 0.054$) (dados não apresentados). Nos grupos analisados, os valores do IMC foram significativamente mais elevados nos indivíduos pertencentes ao grupo 1 com genótipo CT da *MTHFR* (*MTHFR* TT, N = 3) $21.9 \pm 1.8 \text{ kg/m}^2$ *versus* (*MTHFR* CT, N = 40) $29.5 \pm 6.2 \text{ kg/m}^2$ e (*MTHFR* CC, N = 51) $27.8 \pm 5.0 \text{ kg/m}^2$, $p = 0.044$) (dados não apresentados). Por outro lado, nos grupos analisados, observaram-se valores de IMC significativamente mais elevados para os indivíduos com DMII e DMII-DRC, independentemente dos genótipos da *MTHFR* (tabela 17.1).

Numa das atividades relacionados com o eritrócito (RTM), verificou-se por um lado, que os indivíduos com DMII-DRC e com genótipo TT da *MTHFR* apresentaram valores significativamente mais elevados (*MTHFR* TT, N = 7) $20.6 \pm 9.3 \text{ mmol ferricianeto/L célula/h}$ *versus* (*MTHFR* CT, N = 12) $3.7 \pm 2.6 \text{ mmol ferricianeto/L célula/h}$ e (*MTHFR* CC, N = 13) $2.3 \pm 1.0 \text{ mmol ferricianeto/L célula/h}$, $p = 0.045$) (dados não apresentados). Nos grupos analisados, nomeadamente para os grupos 2 e 3, os indivíduos com DPRAD e genótipos CT ou CC da *MTHFR* apresentaram valores significativamente mais

RESULTADOS

elevados (*versus* DMII-DRC ou *versus* DRT) (tabela 17.2). Por outro lado, os indivíduos com DPRAD apresentaram valores mais elevados da atividade da FA, tendo sido significativo nos grupos 1 e 2 para os genótipo CT e CC da *MTHFR* e no grupo 3 apenas para o genótipo CT da *MTHFR* (tabela 17.2).

A idade foi significativamente mais elevada nos indivíduos com DMII, DMII-DRC e DRT, independentemente dos genótipos da *MTHFR* (tabela 17.1).

Para a creatinina, apenas se verificaram valores significativamente mais elevados nos indivíduos com DPRAD e com genótipo CC da *MTHFR* em relação aos indivíduos com DMII (tabela 17.1).

Nos parâmetros relacionados com o metabolismo do ferro, verificou-se que, por um lado, no grupo 2, os indivíduos com DMII-DRC e genótipos CC ou CT apresentaram valores significativamente mais elevados de ferritina (tabela 17.2) e, por outro, no grupo 3, os indivíduos com DRT apresentaram valores significativamente mais elevados de ferritina, independentemente dos genótipos da *MTHFR* (tabela 17.2).

4.4.4. *CβS*

A idade esteve significativamente mais elevada nos indivíduos com genótipos ins/ins e ins/del da *CβS* pertencentes ao grupo 2 (*CβS* del/del, N = 138) 57.0 ± 15 anos *versus* (*CβS* ins/ins e ins/del, N = 42) 61.9 ± 11.7 anos, $p = 0.027$) (dados não apresentados). Tendo-se revelado significativamente mais elevada nos indivíduos com DMII-DRC e DRT nos grupos 2 e 3, independentemente dos genótipos da *CβS*, e apenas, significativamente mais elevadas nos indivíduos com DMII e com genótipo del/del da *CβS* no grupo 2 (tabela 18).

No IMC, observaram-se valores significativamente mais elevados nos indivíduos com DMII, independentemente dos genótipos da *CβS* (grupo 1) e para os indivíduos com DMII-DRC e genótipo del/del da *CβS* (grupo 2) (tabela 18).

Nos parâmetros relacionados com a progressão na doença renal crónica, no grupo 1, os indivíduos com DPRAD e genótipo del/del da *CβS* apresentaram valores de creatinina significativamente mais elevados e os indivíduos com DMII e genótipo de ins/ins e ins/del apresentaram valores da fórmula de Cockcroft-Gault significativamente mais elevados (tabela 18).

A ferritina apresentou-se significativamente mais elevada nos indivíduos com DMII-DRC e DRT, independentemente dos genótipos da *CβS* nos grupos 2 e 3, respectivamente (tabela 18).

Os indivíduos com DPRAD apresentaram valores significativamente mais elevados da atividade da RTM nos grupos 2 e 3, independentemente dos genótipos da *CβS* (tabela 18). Para a FA, observaram-se diferenças significativas nos grupos 1 e 2, com valores mais elevados nos indivíduos com DPRAD, independentemente dos genótipos da *CβS* (tabela 18).

Tabela 16.1: Características antropométricas e parâmetros bioquímicos (creatinina e Cockcroft-Gault) para os grupos DPRAD versus DRT, DMII e DMII-DRC por fenótipos da *Hp* e genótipos da *GSTT1*.

		Idade	p.	IMC	p.	Creatinina	p.	Cockcroft-Gault	p.
DPRAD vs. DRT	1.1	(22) 42.1±14.7 vs. (12) 64.9±15.4	<0.001	(15) 23.9 ± 1.5 [20.8-37.7] vs. (12) 24.7±0.9 [21.5-31.6]	0.942	(23) 1.0±0.2 [0.5-3.5] vs.	n.a.	(20) 77.4±13.6 [19.7-250.4] vs.	n.a.
	2.1	(46) 43.5±14.0 vs. (36) 70.6±14.0	<0.001	(43) 25.2±4.3 vs. (36) 23.3±4.1	0.043	(54) 1.0±0.2 [0.6-6.5] vs.	n.a.	(43) 85.8±45.8 vs.	n.a.
	2.2	(45) 45.1±14.3 vs. (35) 70.5±11.6	<0.001	(37) 25.6±5.0 vs. (35) 25.9±5.7	0.824	(48) 1.0±0.3 [0.5-9.5] vs.	n.a.	(38) 75.6±9.2 [11.7-249.4] vs.	n.a.
<i>Hp</i> DPRAD vs. DMII	1.1	(22) 42.1±14.7 vs. (5) 63.2±9.7	0.006	(15) 23.9±1.5 [20.8-37.7] vs. (5) 30.3±3.3 [29.2-39.6]	0.040	(23) 1.0±0.2 [0.5-3.5] vs. (3) 0.9±0.0 [0.9-1.0]	0.547	(20) 77.4±13.6 [19.7-250.4] vs. (3) 97.5±3.0 [92.8-103.1]	0.465
	2.1	(46) 44.5±2.1 [23-71.0] vs. (20) 62.5±1.7 [42-73]	<0.001	(43) 24.8±0.7 [18.4-37.0] vs. (21) 32.4±1.3 [24.7-50.6]	<0.001	(54) 1.0±0.2 [0.6-0.5] vs. (18) 0.9±5.0.1 [0.6-2.5]	0.197	(43) 96.5±7.0 [10.9-174.9] vs. (16) 109.3±4.7 [90.1-155.7]	0.113
	2.2	(45) 44.0±2.1 [19.0-74.0] vs. (20) 59.0±1.4 [47.0-73.0]	<0.001	(37) 25.6±5.0 vs. (22) 30.3±4.1	<0.001	(48) 1.0±0.3 [0.5-9.5] vs. (17) 0.9±0.1 [0.7-1.6]	0.135	(38) 75.6±9.2 [11.7-249.4] vs. (16) 103.4±2.5 [90.2-125.6]	0.140
DPRAD vs. DMII-DRC	1.1	(22) 38.0± 3.1 [22.0-73.0] vs. (18) 66.0±3.3 [15.0-79.0]	<0.001	(15) 23.9±1.5 [20.8-37.7] vs. (20) 28.1±0.7 [21.8-31.9]	0.243	(23) 1.2±0.2 [0.5-3.5] vs. (17) 1.2±0.2 [0.8-3.3]	0.565	(20) 77.4±13.6 [19.7-250.4] vs. (14) 69.6±4.7 [26.2-83.5]	0.506
	2.1	(46) 44.5±2.1 [23.0-71.0] vs. (77) 67.0±1.0 [31.0-88.0]	<0.001	(43) 24.8±0.7 [18.3-37.0] vs. (84) 29.8±0.5 [21.1-43.8]	<0.001	(54) 1.0±0.2 [0.6-6.5] vs. (76) 1.2±0.1 [0.6-7.6]	0.049	(43) 96.5±7.0 [10.9-174.9] vs. (61) 62.1±2.4 [13.6-89.2]	0.002
	2.2	(45) 44.0±2.1 [19.0-74.0] vs. (39) 65.0±1.2 [46.0-79.0]	<0.001	(37) 25.6±5.0 vs. (46) 27.3±4.5	<0.001	(48) 1.0±0.3 [0.5-9.5] vs. (29) 1.2±0.2 [0.6-4.9]	0.740	(38) 75.6±9.2 [11.7-249.4] vs. (20) 67.1±3.0 [44.4-89.8]	0.756
DPRAD vs. DRT	Nulo	(16) 41.6±16.4 vs. (12) 61.1±17.5	0.006	(13) 24.4±4.1 vs. (12) 23.9±3.6	0.763	(14) 0.9±0.5 [0.6-5.7] vs.	n.a.	(13) 92.5±55.2 vs.	n.a.
<i>GSTT1</i> DPRAD vs. DMII	Não Nulo	(48) 46.0±2.0 [22.0-73.0] vs. (57) 73.0±1.6 [25.0-91.0]	<0.001	(37) 25.0±0.8 [19.4-38.9] vs. (57) 24.2±0.5 [15.2-35.4]	0.192	(50) 1.4±0.2 [0.6-7.6] vs.	n.a.	(44) 76.2±7.7 [14.5-249.4] vs.	n.a.
	Nulo	(16) 41.6±16.4 vs. (14) 59.3±9.7	0.001	(13) 24.4±4.1 vs. (14) 32.0±5.1	<0.001	(14) 0.9±0.5 [0.6-5.7] vs. (12) 0.9±0.0 [0.7-1.1]	0.718	(13) 107.5±15.3 [10.9-174.9] vs. (12) 102.4±4.5 [92.1-147.5]	0.870
	Não Nulo	(48) 46.0±2.0 [22.0-73.0] vs. (26) 60.0±1.1 [49.0-73.0]	<0.001	(37) 26.1±4.8 vs. (28) 31.1±5.2	<0.001	(50) 1.4±0.2 [0.6-7.6] vs. (22) 0.9±0.1 [0.6-2.5]	0.009	(44) 76.2±7.7 [14.5-249.4] vs. (19) 103.2±3.6 [90.0-156.0]	0.053
	Nulo	(16) 35.0±4.1 [23.0-71.0] vs. (31) 68.0±1.2 [49.0-77.0]	<0.001	(13) 24.4±4.1 vs. (34) 28.9±5.2	0.007	(14) 0.9±0.5 [0.6-5.7] vs. (30) 1.1±0.1 [0.6-4.0]	0.398	(13) 107.5±15.3 [10.9-174.9] vs. (24) 68.7±3.2 [20.6-86.3]	0.049
	Não Nulo	(48) 46.0±2.0 [22.0-73.0] vs. (83) 65.0±0.8 [46.0-88.0]	<0.001	(37) 26.1±4.8 vs. (88) 28.4±4.9	0.015	(50) 1.4±0.2 [0.6-7.6] vs. (69) 1.2±0.1 [0.6-4.1]	0.506	(44) 76.2±7.7 [14.5-249.4] vs. (59) 62.7±2.3 [13.6-89.8]	0.337

Os valores para os genótipos representam frequências absolutas; *Hp*, haptoglobina; *GSTT1*, glutatono s-transferase T1; *GSTM1*, glutatono s-transferase M1; DPRAD, doença poliquística renal autossômica dominante; DRT, doença renal crônica; DMII, diabetes *mellitus* tipo II; DRC, doença renal crônica; IMC, índice de massa corporal; n.a., não aplicável; vs., versus; OR, odds ratio proveniente da logística binária; IC, intervalo de confiança; *Hp* 1.1, *Hp* 1.1 versus *Hp* 2.1 e *Hp* 2.2; *Hp* 2.1, *Hp* 2.1 versus *Hp* 1.1 e *Hp* 2.2; *Hp* 2.2, *Hp* 2.2 versus *Hp* 1.1 e *Hp* 2.1; Valores significativos para $p < 0.05$.

Tabela 16.2: Parâmetros bioquímicos (ferritina, ferro, FA e RTM) para os grupos DPRAD versus DRT, DMII e DMII-DRC por fenótipos da *Hp* e genótipos da *GSTT1*

	Ferritina	p.	Ferro	p.	FA	p.	RTM	p.
DPRAD vs. DRT	1.1	(18) 55.3±27.7 [4.2-519.1] vs. (12) 498.0±63.7 [266.0-957.9]	(19) 79.3±28.0 vs. (12) 88.3±27.6	0.392	(21) 390.2±34.2 [210.4-752.3] vs. (12) 355.4±19.2 [246.6-486.1]	0.246	(15) 4.2±1.3 vs. (12) 4.2±1.8	0.931
	2.1	(45) 100.8±43.0 [6.0-1489.0] vs. (25) 431.0±39.0 [153.0-1080.0]	(46) 73.9±30.3 vs. (25) 71.0±29.2	0.695	(52) 354.2±126.5 vs. (31) 314.2±100.4	0.137	(47) 5.0±0.5 [1.9-15.7] vs. (30) 2.0±0.4 [0.2-9.0]	<0.001
	2.2	(38) 88.8±16.3 [10.8-477.9] vs. (24) 379.0±43.3 [70.0-983.0]	(42) 81.1±28.3 vs. (24) 64.7±19.2	0.014	(49) 339.3±126.9 vs. (32) 333.8±109.8	0.842	(39) 5.1±1.9 vs. (32) 2.6±2.0	<0.001
	1.1	(18) 55.3±27.7 [4.2-519.1] vs. (-) (-)	(19) 79.3±28.0 vs. (-) (-)	n.a.	(21) 436.2±156.6 vs. (6) 170.3±43.9	<0.001	(15) 4.2±1.3 vs. (-) (-)	n.a.
	2.1	(45) 100.8±43.0 [6.0-1489.0] vs. (-) (-)	(46) 73.9±30.3 vs. (1) 50.0	0.440	(52) 367.8±17.5 [56.7-630.9] vs. (23) 145.7±17.5 [56.7-630.9]	<0.001	(47) 5.7±3.1 vs. (-) (-)	n.a.
	2.2	(38) 88.8±16.3 [10.8-477.9] vs. (-) (-)	(42) 81.1±28.3 vs. (1) 71.0	0.727	(49) 322.5±13.1 [110.6-614.7] vs. (21) 147.9±10.0 [69.2-247.0]	<0.001	(39) 5.1±1.9 vs. (-) (-)	n.a.
DPRAD vs. DMII	1.1	(18) 55.3±27.7 [4.2-509.1] vs. (5) 310.0±109.9 [107.6-704.0]	(19) 79.3±28.0 vs. (5) 66.6±28.3	0.377	(21) 436.2±156.6 vs. (17) 207.7±100.6	<0.001	(15) 4.2±1.3 vs. (4) 2.6±2.9	0.365
	2.1	(45) 100.8±43.0 [6.0-1489.0] vs. (18) 176.6±57.7 [11.1-971.0]	(46) 73.9±30.3 vs. (18) 57.9±15.3	0.055	(52) 367.8±17.5 [56.7-630.9] vs. (74) 152.4±10.6 [58.7-637.2]	<0.001	(47) 5.7±3.1 vs. (15) 3.3±2.5	0.009
	2.2	(38) 88.8±16.3 [10.8-477.9] vs. (19) 357.0±54.7 [23.5-936.0]	(42) 81.1±28.3 vs. (19) 75.2±29.8	0.461	(49) 322.5±13.1 [110.6-614.7] vs. (44) 210.4±18.0 [73.2-516.5]	<0.001	(39) 5.1±1.9 vs. (20) 3.7±2.5	0.027
	Nulo	(8) 100.8±86.5 vs. (7) 338.1±137.3±51.9	(12) 81.6±41.0 vs. (7) 57.6±17.2	0.161	(15) 427.7±145.1 vs. (11) 316.7±126.4	0.055	(14) 6.3±2.2 vs. (11) 2.5±1.8	<0.001
	Não	(36) 92.4±24.3 [6.0-796.4] vs. (48) 433.5±31.2 [70.0-1080.0]	(40) 75.4±31.0 vs. (48) 74.8±27.7	0.925	(44) 401.9±22.0 [147.5-752.3] vs. (53) 354.0±12.6 [106.7-574.3]	0.014	(38) 6.0±2.8 vs. (51) 3.3±2.1	<0.001
	Nulo	(8) 100.2±86.5 vs. (-) (-)	(12) 81.6±41.0 vs. (-) (-)	n.a.	(15) 474.2±37.5 [139.7-630.9] vs. (15) 151.4±11.1 [69.2-217.6]	<0.001	(14) 6.3±2.2 vs. (-) (-)	n.a.
DPRAD vs. DMII-DRC	Não	(36) 92.4±24.3 [6.0-796.4] vs. (2) 79.4±30.6 [6.0-796.4]	(40) 75.4±31.0 vs. (2) 60.5±14.8	0.505	(44) 401.9±22.0 [147.5-752.3] vs. (30) 156.2±10.8 [101.7-386.0]	<0.001	(38) 6.0±2.8 vs. (-) (-)	n.a.
	Nulo	(8) 77.3±390.6 [16.5-69.3] vs. (11) 325.0±90.1 [33.5-936.0]	(12) 81.6±41.0 vs. (11) 62.1±22.8	0.179	(15) 474.2±37.5 [139.7-630.9] vs. (34) 157.9±22.9 [58.7-637.2]	<0.001	(14) 6.3±2.2 vs. (7) 4.9±3.5	0.283
	Não	(36) 92.4±24.3 [6.0-796.4] vs. (24) 305.5±49.5 [11.1-971.0]	(40) 75.4±31.0 vs. (24) 69.5±24.8	0.429	(44) 401.9±22.0 [147.5-752.3] vs. (86) 164.8±10.3 [73.2-502.7]	<0.001	(38) 6.1±0.5 [0.9-14.4] vs. (26) 3.1±0.7 [0.3-19.6]	<0.001
	Nulo	(8) 100.2±86.5 vs. (-) (-)	(12) 81.6±41.0 vs. (-) (-)	n.a.	(15) 474.2±37.5 [139.7-630.9] vs. (15) 151.4±11.1 [69.2-217.6]	<0.001	(14) 6.3±2.2 vs. (-) (-)	n.a.
	Não	(36) 92.4±24.3 [6.0-796.4] vs. (2) 79.4±30.6 [6.0-796.4]	(40) 75.4±31.0 vs. (2) 60.5±14.8	0.505	(44) 401.9±22.0 [147.5-752.3] vs. (30) 156.2±10.8 [101.7-386.0]	<0.001	(38) 6.0±2.8 vs. (-) (-)	n.a.
	Nulo	(8) 77.3±390.6 [16.5-69.3] vs. (11) 325.0±90.1 [33.5-936.0]	(12) 81.6±41.0 vs. (11) 62.1±22.8	0.179	(15) 474.2±37.5 [139.7-630.9] vs. (34) 157.9±22.9 [58.7-637.2]	<0.001	(14) 6.3±2.2 vs. (7) 4.9±3.5	0.283

Os valores para os genótipos representam frequências absolutas; *Hp*, haptoglobina; *GSTT1*, glutatono s-transferase T1; *GSTM1*, glutatono s-transferase M1; *DPRAD*, doença poliquística renal autossômica dominante; *DRT*, doença renal crônica; *DMII*, diabetes *mellitus* tipo II; *DRC*, doença renal crônica; *fa*, fosfatase ácida; *RTM*, redutase transmembranar; n.a., não aplicável; vs., versus; *OR*, odds ratio proveniente da logística binária; *IC*, intervalo de confiança; *Hp* 1.1, *Hp* 1.1 versus *Hp* 2.1 e *Hp* 2.2; *Hp* 2.1 versus *Hp* 1.1 e *Hp* 2.2; *Hp* 2.2 versus *Hp* 1.1 e *Hp* 2.1; Valores significativos para $p < 0.05$.

Tabela 17.1: Características antropométricas e parâmetros bioquímicos (creatinina e Cockcroft-Gault) para os grupos DPRAD versus DRT, DMII e DMII-DRC por genótipos da *MTHFR* e da *GSTM1*

		Idade	p.	IMC	p.	Creatinina	p.	Cockcroft-Gault	p.
<i>MTHFR</i>	DPRAD vs. DRT	TT (7) 42.2±13.7 vs. (4) 73.0±4.5	0.001	(3) 21.9±1.8 vs. (4) 23.8±3.9	0.472	(7) 1.4±0.7 vs. (-) (-)	n.a.	(6) 83.1±50.8 vs (-) (-)	n.a.
		CT (22) 44.0±14.3 vs. (21) 71.9±12.1	<0.001	(17) 25.0±3.8 vs. (21) 23.4±3.5	0.186	(21) 1.0±0.4 [0.6-6.0] vs. (-) (-)	n.a.	(19) 80.2±48.6 vs. (-) (-)	n.a.
		CC (35) 44.0±2.5 [23.0-73.0] vs. (38) 72.0±1.9 [25.0-83.0]	<0.001	(30) 25.5±0.9 [19.4-38.9] vs. (38) 25.5±0.8 [18.4-44.4]	0.411	(36) 1.3±0.3 [0.6-7.6] vs. (-) (-)	n.a.	(32) 81.5±55.8 vs. (-) (-)	n.a.
	DPRAD vs. DMII	TT (7) 42.2±13.7 vs. (-) (-)	n.a.	(3) 21.9±1.8 vs. (-) (-)	n.a.	(7) 1.0±0.3 [0.8-2.6] vs. (-) (-)	n.a.	(6) 83.1±50.8 vs (-) (-)	n.a.
		CT (22) 44.0±14.3 vs. (23) 60.8±7.2	<0.001	(17) 25.0±3.8 vs. (23) 32.9±5.5	<0.001	(21) 1.0±0.4 [0.6-6.0] vs. (19) 0.9±0.0 [0.7-1.2]	0.175	(19) 97.2±11.2 [11.7-154.0] vs. (19) 103.6±3.0 [90.0-147.5]	0.237
		CC (35) 44.0±2.5 [23.0-73.0] vs. (19) 59.0±1.6 [42.0-75.0]	0.002	(30) 26.4±5.1 vs. (21) 29.9±4.1	0.012	(36) 1.3±0.3 [0.6-7.6] vs. (17) 0.9±0.1 [0.6-2.5]	0.052	(32) 86.5±9.9 [10.9-249.4] vs. (14) 103.3±4.7 [90.7-156.0]	0.189
<i>GSTM1</i>	DPRAD vs. DMII-DRC	TT (7) 42.2±13.7 vs. (8) 67.1±7.5	0.002	(3) 21.9±1.8 vs. (14) 26.9±2.8	0.010	(7) 1.0±0.3 [0.8-2.6] vs. (13) 1.4±0.2 [0.6-3.2]	0.526	(6) 83.1±50.8 vs (5) 64.7±19.5	0.468
		CT (22) 45.5±3.0 [22.0-71.0] vs. (54) 66.0±1.0 [46.0-88.0]	<0.001	(17) 24.0±0.9 [20.6-32.4] vs. (57) 28.1±0.7 [20.0-43.8]	0.026	(21) 1.0±0.4 [0.6-6.0] vs. (48) 1.1±1.2 [0.6-7.6]	0.886	(19) 97.2±11.2 [11.7-154.0] vs. (42) 62.9±2.4 [20.6-89.8]	0.171
		CC (35) 44.0±2.5 [23.0-73.0] vs (52) 65.5±1.0 [47.0-75.0]	<0.001	(30) 26.4±5.1 vs. (54) 30.0±4.2	0.002	(36) 1.3±0.3 [0.6-7.6] vs. (46) 1.2±0.1 [0.8-4.0]	0.772	(32) 86.5±9.9 [10.9-249.4] vs. (40) 67.0±2.6 [26.2-89.2]	0.377
	DPRAD vs. DRT	Nulo (37) 43.5±15.1 vs. (29) 67.5±14.6	<0.001	(28) 24.7±4.6 vs. (29) 24.8±3.6	0.960	(36) 1.0±0.2 [0.6-5.0] vs. (-) (-)	n.a.	(33) 87.8±55.8 vs. (-) (-)	n.a.
		Não Nulo (25) 47.6±12.8 vs. (40) 71.00±12.7	<0.001	(20) 26.2±1.0 [19.6-33.3] vs. (40) 24.0±0.6 [15.2-35.4]	0.039	(26) 1.8±0.3 [0.6-7.6] vs. (-) (-)	n.a.	(22) 71.5±45.8 vs. (-) (-)	n.a.
		Nulo (37) 43.5±15.1 vs. (15) 60.2±7.7	<0.001	(28) 24.7±4.6 vs. (17) 31.1±4.9	<0.001	(36) 1.0±0.2 [0.6-5.0] vs (13) 0.9±0.1 [0.7-1.8]	0.440	(33) 106.9±9.7 [10.9-249.4] vs. (11) 103.2±4.5 [92.3-147.5]	0.524
<i>GSTM1</i>	DPRAD vs. DMII	Não Nulo (25) 48.0±2.6 [23.0-66.0] vs. (25) 62.0±1.4 [42.0-73.0]	0.001	(20) 26.2±1.0 [19.6-33.3] vs. (25) 31.9±1.1 [24.7-50.6]	0.003	(26) 1.8±0.3 [0.6-7.6] vs. (22) 0.8±0.1 [0.6-2.5]	0.002	(22) 65.8±9.8 [16.9-154.0] vs. (21) 103.5±3.4 [90.0-156.0]	0.013
		Nulo (37) 42.0±2.5 [22.0-73.0] vs. (52) 66.0±0.9 [53.0-88.0]	<0.001	(28) 23.8±0.9 [19.4-38.9] vs. (56) 27.8±0.6 [14.7-39.5]	0.002	(36) 1.0±0.2 [0.6-5.0] vs (47) 1.1±0.1 [0.6-4.1]	0.440	(33) 106.9±9.7 [10.9-249.4] vs. (37) 70.8±3.2 [13.6-89.8]	0.034
		Não Nulo (25) 48.0±2.6 [23.0-66.0] vs. (59) 66.0±1.0 [47.0-83.0]	<0.001	(20) 27.0±4.5 vs. (64) 29.3±5.1	0.075	(26) 1.8±0.3 [0.6-7.6] vs. (50) 1.2±0.1 [0.8-4.0]	0.148	(22) 65.8±9.8 [16.9-154.0] vs. (43) 62.1±2.3 [26.2-89.2]	0.956

Os valores para os genótipos representam frequências absolutas; *MTHFR*, metilenoetetrahidrofolato redutase; *GSTM1*, glutatono s-transferase M1; DPRAD, doença poliquística renal autosômica dominante; DRT, doença renal crônica; DMII, diabetes mellitus tipo II; DRC, doença renal crônica; IMC; índice de massa corporal; n.a., não aplicável; vs., versus; OR, odds ratio proveniente da logística binária; IC, intervalo de confiança; *MTHFR* TT, *MTHFR* TT versus *MTHFR* CT e *MTHFR* CC; *MTHFR* CT, *MTHFR* CT versus *MTHFR* CC e *MTHFR* TT; *MTHFR* CC, *MTHFR* CC versus *MTHFR* TT e *MTHFR* CT. Valores significativos para $p < 0.05$.

Tabela 17.2: Parâmetros bioquímicos (ferritina, ferro, FA e RTM) para os grupos DPRAD versus DRT, DMII e DMII-DRC por genótipos da *MTHFR* e da *GSTM1*

		Ferritina	p.	Ferro	p.	FA	p.	RTM	p.
DPRAD vs. DRT	TT	(6) 110.3±61.4 vs. (3) 212.3±52.5	0.044	(7) 72.4±34.1 vs. (3) 49.0±19.1	0.306	(5) 343.8±102.3 vs. (3) 361.8±123.7	0.830	(5) 6.0±1.9 vs. (2) 3.9±1.6	0.247
	CT	(14) 92.6±17.9 [15.3-269.3] vs. (16) 432.0±50.8 [70.0-914.0]	<0.001	(17) 74.5±36.6 vs. (16) 65.6±22.0	0.401	(20) 420.5±134.2 vs. (19) 329.0±81.1	0.015	(19) 6.0±2.1 vs. (18) 3.0±2.0	<0.001
	CC	(24) 86.3±36.0 [0.6-796.4] vs. (27) 481.0±44.2 [137.0-1080.0]	<0.001	(28) 79.4±31.8 vs. (27) 78.3±29.0	0.891	(34) 399.0±156.9 vs. (34) 335.8±111.0	0.060	(26) 5.6 ± 2.5 vs. (35) 2.8±1.9	<0.001
	TT	(6) 112.0±25.1 [34.7-213.7] vs. (-) (-)	n.a.	(7) 72.4±34.1 vs. (-) (-)	n.a.	(5) 343.8±102.3 vs. (-) (-)	n.a.	(5) 6.0±1.9 vs. (-) (-)	n.a.
DPRAD vs. DMII	CT	(14) 99.0±67.2 vs. (-) (-)	n.a.	(17) 74.5±36.6 vs. (-) (-)	n.a.	(20) 439.8±30.0 [177.5-630.9] vs. (27) 149.2±12.3 [91.2-437.6]	<0.001	(19) 6.0±2.1 vs. (-) (-)	n.a.
	CC	(24) 86.3±36.0 [0.6-796.4] vs. (2) 79.4±30.6 [48.8-110.0]	1.000	(28) 79.4±31.8 vs. (2) 60.5±14.8	0.418	(34) 398.5±26.9 [139.7-752.3] vs. (21) 148.1±16.8 [40.8-386.0]	<0.001	(26) 5.6 ± 2.5 vs (-) (-)	n.a.
	TT	(6) 112.0±25.1 [34.7-213.7] vs. (8) 121.0±107.9 [23.5-872.0]	0.699	(7) 72.4±34.1 vs. (8) 68.9±25.3	0.822	(5) 343.8±102.3 vs. (14) 296.9±191.1	0.612	(5) 6.0±1.9 vs. (7) 4.7±2.2	0.312
	CT	(14) 92.6±17.9 [15.3-269.3] vs (15) 289.0±50.9 [11.1-627.01]	0.005	(17) 74.5±36.6 vs (15) 59.9±26.7	0.215	(20) 439.8±30.0 [177.5-630.9] vs. (56) 157.2±11.6 [58.7-497.3]	<0.001	(19) 6.0±2.1 vs. (12) 3.7±2.6	0.010
DPRAD vs. DMII-DRC	CC	(24) 86.3±36.0 [0.6-796.4] vs. (13) 310.0±48.7 [91.8-682.0]	<0.001	(28) 79.4±31.8 vs. (13) 67.2±25.0	0.230	(34) 398.5±26.9 [139.7-752.3] vs (56) 106.2±15.1 [65.0-502.7]	<0.001	(26) 5.6 ± 2.5 vs. (15) 2.4±1.3 [1.0-19.6]	<0.001
	Nulo	(24) 91.5±32.2 [15.0-796.4] vs. (23) 439.0±46.7 [153.0-1080.0]	<0.001	(29) 80.5±33.8 vs. (23) 72.6±25.8	0.358	(33) 395.0±137.7 vs. (27) 335.7±100.2	0.067	(26) 6.3±2.1 vs. (28) 3.1±1.8	<0.001
	Não	(20) 91.0±24.2 [6.0-519.1] vs. (32) 399.0±36.6 [70.0-983.0]	<0.001	(22) 72.4±33.3 vs. (32) 72.7±28.3	0.969	(24) 407.3±162.3 vs. (37) 320.1±97.2	0.024	(21) 5.1±2.0 vs. (34) 3.3±2.2	0.004
	Nulo	(24) 91.5±32.2 [15.0-796.4] vs. (2) 79.4±30.6 [48.8-110.0]	1.000	(29) 80.5±33.8 vs. (2) 60.5±14.8	0.419	(33) 406.9±24.0 [139.7-710.8] vs. (17) 138.6±16.6 [69.2-386.0]	<0.001	(26) 6.3±2.1 vs. (-) (-)	n.a.
GSTM1	Não	(20) 91.0±24.2 [6.0-519.1] vs. (-) (-)	n.a.	(22) 72.4±33.3 vs. (-) (-)	n.a.	(24) 432.3±33.1 [147.5-752.3] vs. (28) 151.3±8.5 [108.1-280.8]	<0.001	(21) 5.1±2.0 vs. (-) (-)	n.a.
	Nulo	(24) 91.5±32.2 [15.0-796.4] vs (19) 344.0±57.6 [33.5-936.0]	<0.001	(29) 80.5±33.8 vs. (19) 67.4±24.0	0.152	(33) 406.9±24.0 [139.7-710.8] vs. (57) 173.7±16.0 [58.7-637.2]	<0.001	(26) 6.3±2.1 vs. (15) 3.6±2.2	<0.001
	Não	(20) 91.0±24.2 [6.0-519.1] vs. (17) 272.0±66.8 [11.1-971.0]	0.002	(22) 72.4±33.3 vs. (17) 65.8±24.7	0.502	(24) 432.3±33.1 [147.5-752.3] vs. (60) 164.4±12.0 [73.2-502.7]	<0.001	(21) 5.1±2.0 vs. (16) 3.1±1.9	0.005
	Nulo	(24) 91.5±32.2 [15.0-796.4] vs. (19) 344.0±57.6 [33.5-936.0]	<0.001	(29) 80.5±33.8 vs. (19) 67.4±24.0	0.152	(33) 406.9±24.0 [139.7-710.8] vs. (57) 173.7±16.0 [58.7-637.2]	<0.001	(26) 6.3±2.1 vs. (15) 3.6±2.2	<0.001

Os valores para os genótipos representam frequências absolutas; *MTHFR*, metilenoetetrahidrofolato redutase; *GSTM1*, glutationato s-transferase M1; DPRAD, doença poliquística renal autossômica dominante; DRT, doença renal crônica; DMII, diabetes *mellitus* tipo II; DRC, doença renal crônica; FA, fosfatase ácida; RTM, redutase transmembranar; n.a., não aplicável; vs., versus; OR, odds ratio proveniente da logística binária; IC, intervalo de confiança; *MTHFR* TT, *MTHFR* TT versus *MTHFR* CT e *MTHFR* CC; *MTHFR* CT, *MTHFR* CT versus *MTHFR* CC e *MTHFR* TT; *MTHFR* CC, *MTHFR* CC versus *MTHFR* TT e *MTHFR* CT. Valores significativos para $p < 0.05$.

Tabela 18: Características antropométricas e parâmetros bioquímicos para os grupos DPRAD versus DRT, DMII e DMII-DRC por genótipos da C β S.

	Idade	p.	IMC	p.	Creatinina	p.	Cockcroft-Gault	p.
DPRAD vs. DRT	del/del (51) 44.0±2.0 [22.0-7.0] vs. (52) 72.5±1.7 [25.0-87.0]	<0.001	(40) 24.0±0.7 [19.4-33.3] vs. (52) 25.2±0.6 [18.4-44.4]	0.943 (52) (-)	(52) 1.3±0.2 [0.6-7.6] vs.	n.a.	(46) 92.3±7.1 [10.9-174.8] vs.	n.a.
	Ins/ins & ins/del (9) 73.4±12.4	0.001	(10) 26.8±4.5 vs. (9) 22.7±4.5	0.058 (-) (-)	(12) 1.1±0.5 [0.7-6.0] vs.	n.a.	(11) 70.6±43.5 vs.	n.a.
DPRAD vs. DMII	del/del (51) 44.0±2.0 [22.0-7.0] vs. (32) 60.0±1.3 [48.0-75.0]	<0.001	(40) 25.1±4.2 vs. (32) 31.5±5.3	<0.001	(52) 1.3±0.2 [0.6-7.6] vs. (26) 0.9±0.0 [0.6-1.2]	0.006	(46) 92.3±7.1 [10.9-174.8] vs. (26) 103.6±3.1 [90.2-156.0]	0.127
	Ins/ins & ins/del (11) 60.0±2.3 [42.0-68.0]	0.087 (13) 55.0±3.8 [30.0-71.0] vs. (11) 60.0±2.3 [42.0-68.0]	(10) 26.8±4.5 vs. (13) 30.9±4.5	0.044 (10) 1.0±0.2 [0.7-2.5]	(12) 1.1±0.5 [0.7-6.0] vs.	0.488	(11) 70.6±43.5 vs. (7) 104.2±13.1	0.033
DPRAD vs. DMII-DRC	del/del (51) 44.0±2.0 [22.0-7.0] vs. (87) 66.0±0.8 [46.0-88.0]	<0.001	(40) 25.1±4.2 vs. (97) 28.6±5.1	<0.001	(52) 1.3±0.2 [0.6-7.6] vs. (84) 1.2±0.1 [0.6-4.1]	0.886	(46) 92.3±7.1 [10.9-174.8] vs. (68) 65.7±2.0 [13.6-89.8]	0.122
	Ins/ins & ins/del (13) 55.0±3.8 [30.0-71.0] vs. (29) 68.0±1.1 [53.0-79.0]	<0.001	(10) 26.8±4.5 vs. (30) 28.8±3.0	0.215 (23) 1.1±1.2 [0.8-4.0]	(12) 1.1±0.5 [0.7-6.0] vs.	0.821	(11) 70.6±43.5 vs. (21) 61.6±19.3	0.526
CβS	Ferritina	p.	Ferro	p.	FA	p.	RTM	p.
DPRAD vs. DRT	del/del (34) 90.1±23.3 [6.0-796.4] vs. (38) 436.5±38.3 [70.0-1080.0]	<0.001	(40) 74.0±34.3 vs. (38) 70.9±23.8	0.654 (46) 395.2±21.4 [139.7-752.2] vs. (45) 359.7±14.9 [106.0-574.3]	(46) 395.2±21.4 [139.7-752.2] vs. (45) 359.7±14.9 [106.0-574.3]	0.085	(39) 5.6±2.1 vs. (46) 2.9±1.8	<0.001
	Ins/ins & ins/del (11) 139.3±134.6 vs. (8) 389.9±140.8	0.001	(12) 82.0±27.5 vs. (8) 81.9±45.5	0.994 (9) 356.5±97.0	(13) 433.9±145.4 vs. (9) 356.5±97.0	0.179	(11) 5.8±2.2 vs. (7) 3.1±1.8	0.017
DPRAD vs. DMII	del/del (34) 90.1±23.3 [6.0-796.4] vs. (-) (-)	n.a.	(40) 74.0±34.3 vs. (-) (-)	n.a.	(46) 395.2±21.4 [139.7-752.2] vs. (35) 153.5±8.4 [40.8-280.8]	0.001	(39) 5.6±2.1 vs. (-) (-)	n.a.
	Ins/ins & ins/del (11) 92.7±40.6 [21.6-519.1] vs. (2) 79.4±30.6 [48.8-110.0]	0.430 (12) 82.0±27.5 vs. (2) 60.5±14.8	(12) 82.0±27.5 vs. (2) 60.5±14.8	0.312 (13) 144.6±20.3 [11.7-386.0]	(13) 461.2±40.3 [147.5-620.7] vs. (13) 144.6±20.3 [11.7-386.0]	<0.001	(11) 5.8±2.2 vs. (-) (-)	n.a.
DPRAD vs. DMII-DRC	del/del (34) 90.1±23.3 [6.0-796.4] vs. (34) 279.0±45.9 [27.3-872.0]	<0.001	(40) 74.0±34.3 vs. (24) 67.6±27.7	0.443 (46) 395.2±21.4 [139.7-752.2] vs. (97) 162.8±11.2 [65.0-637.2]	(46) 395.2±21.4 [139.7-752.2] vs. (97) 162.8±11.2 [65.0-637.2]	<0.001	(39) 5.6±2.1 vs. (24) 3.2±2.2	<0.001
	Ins/ins & ins/del (11) 92.7±40.6 [21.6-519.1] vs. (9) 404.0±64.0 [11.1-578.0]	0.030	(12) 82.0±27.5 vs. (9) 63.0±17.7	0.087 (30) 165.3±24.6 [58.7-719.8]	(13) 461.2±40.3 [147.5-620.7] vs. (30) 165.3±24.6 [58.7-719.8]	<0.001	(11) 5.8±2.2 vs. (7) 3.3±1.7	0.026

Os valores para os genótipos representam frequências absolutas; C β S, cistationina β -sintase; DPRAD, doença poliquística renal autossômica dominante; DRT, doença renal crônica; DMII, diabetes *mellitus* tipo II; DRC, doença renal crônica; IMC; índice de massa corporal; FA, fosfatase ácida; RTM, redutase transmembranar; n.a., não aplicável; vs., versus; OR, odds ratio proveniente da logística binária; IC, intervalo de confiança; C β S del/del, C β S del/del versus C β S ins/ins; C β S ins/del, C β S ins/del versus C β S del/del e C β S ins/ins; C β S ins/ins, C β S ins/ins versus C β S del/del e C β S ins/ins. Valores significativos para $p < 0.05$.

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

Os polimorfismos estudados foram selecionados tendo em conta a sua relação com a via da homocisteína (remetilação da Hc e transulfuração, com formação de cisteína como precursor de SH₂, de GSH e de sulfatos), que é um aminoácido fortemente associado às DCVs associadas a vias envolvidas no stress oxidante. Para os polimorfismos referidos foram reportados estudos com evidência na modelação da DPR e progressão para a DRT, com contribuição da DMII ^{147,166,208}.

Em todos os polimorfismos foram observadas diferenças significativas para a idade, o que nos indica que a influencia dos polimorfismos sobre os parâmetros bioquímicos e antropométricos está dependente da idade. Inclusivamente a progressão para todas as patologias estudadas está associada de uma forma teórica com a idade.

5.1. Fenótipo Intermédio

Foram analisados alguns parâmetros que poderão contribuir para entender a fisiopatologia associada à progressão para a DRC uma vez que a passagem de umas fases para outras é muito heterogénea. Para este propósito, os parâmetros selecionados foram analisados e comparados em indivíduos com uma predisposição genética (monogénica mendeliana) para a DRC (DPRAD) com indivíduos que ainda não apresentavam disfunção renal (DMII), por outro lado, indivíduos que tinham DRC associada à DMII (DMII-DRC) e, por fim, em indivíduos com doença renal terminal (estádio 5).

Os indivíduos com DPRAD eram mais jovens em relação aos outros grupos estudados o que poderá ser justificado pela etiologia monogénica mendeliana da DPRAD sendo estes seguidos mais precocemente. Por outro lado, tal como seria expectável, os doentes com DRT e DMII tinham uma média de idades mais elevada em relação aos doentes com DPRAD.

Na avaliação da composição corporal, e tal como seria de esperar, a prevalência de excesso de peso e obesidade foi superior nos indivíduos com DMII e DMII-DRC, apresentando valores de IMC superiores relativamente ao grupos de indivíduos com DPRAD. Sabe-se que cerca de 90% dos indivíduos com DMII têm excesso de peso ou obesidade²⁰⁹, por outro lado, também se observou que os indivíduos com DPRAD apresentavam um IMC ligeiramente acima do valor de referência do peso normal.

Segundo a fórmula de Cockcroft-Gault, os indivíduos com DMII não apresentavam disfunção renal, tendo valores mais elevados em relação os indivíduos com DPRAD, no entanto, para DPRAD e DMII-DRC, verificou-se o oposto, uma vez que os indivíduos com DMII-DRC encontravam-se maioritariamente em estádios mais avançados do que os indivíduos com DPRAD. Sendo este padrão de disfunção renal também observado nos indivíduos com DMII-DRC em relação aos com DPRAD, com valores mais elevados de creatinina (pior depuração da creatinina), reflectindo a sua progressão para a DRC.

Os indivíduos com DRC de estádios mais avançados ou que realizam hemodiálise são caracterizados por uma deficiência de ferro funcional que resulta do estado inflamatório crónico ²¹⁰, no entanto, na nossa amostra, os indivíduos com DMII e DMII-DRC apresentam valores mais baixos do que os indivíduos com DRT. De facto, os indivíduos em terapia substitutiva da função renal, de uma forma geral, tomam suplementos de eritropoetina (EPO) ²¹¹, uma vez que a EPO controla a eritropoiese, que por sua vez, torna os níveis de Hb mais estáveis e, consequentemente, aumentam os níveis de ferro.

No entanto, quando se analisaram os níveis de ferro plasmático nos indivíduos com DPRAD eram mais elevados em comparação com as outras patologias estudadas. Foi demonstrado que as células intersticiais renais (dos quistos com maiores dimensões) e o fluído que se encontra dentro dos quistos, produzem EPO. Os indivíduos com DPRAD nos estádios iniciais da DRC poderão apresentar uma ligeira perda de ferro que é compensada pela produção de EPO pelos quistos, contribuindo para uma maior estabilidade da Hb e consequentemente do ferro plasmático ²¹². Assim nas fases mais precoces da DRC os níveis de EPO estão mais aumentados na DPRAD dos que nas outras patologias que podem conduzir também à DRC, no entanto, este aumento pode ser inibido nos estádios mais avançados devido à uremia que bloqueia a resposta da medula óssea à EPO ²¹².

O papel do ferro e da ferritina poderá estar subjacente em condições de inflamação crónica como na DMII, na DRC e DPRAD. No nosso estudo, verificou-se que os indivíduos com DRT tinham níveis mais elevados de ferritina, ao passo que, os indivíduos com DMII-DRC e DPRAD apresentaram valores de ferritina mais baixos. Normalmente, a ferritina relaciona-se com o estado dos depósitos de ferro no organismo, e esta aumenta se existir uma sobrecarga de ferro. No entanto, a ferritina é uma proteína de fase aguda, e por isso, está aumentada em casos de condições de

inflamação crónica como é o caso da DRT, DMII e DMII-DRC, não sendo necessário existir uma aumento de ferro sérico, que poderá ser captado e armazenado pelos macrófagos ²¹³.

Tal como ocorre com o ferro e a ferritina, a redutase transmembranar (RTM) dos eritrócitos está associada aos processos de controlo do stresse oxidante, bem como de apoptose e envelhecimento celular, sendo activada por alguns factores de crescimento como a insulina (IGF1) e a EPO ²¹⁴. Desta forma, tendo em conta os níveis elevados de EPO nos indivíduos com DPRAD, a actividade da RTM esteve aumentada, em relação aos indivíduos com DRT e DMII-DRC.

Outros enzimas estão relacionados com regulação do crescimento celular e do metabolismo energético, como o caso da FA do citoplasma do glóbulo vermelho. Em relação ao comportamento da atividade da FA no presente estudo, as diferenças de idade entre os grupos poderá ter interferido na sua atividade, uma vez que esta é inversamente proporcional à idade dos glóbulos vermelhos. Por outro lado as diferenças encontradas nos DMII e na DMII-DRC em relação com os indivíduos com DPRAD podem ser explicados pela resposta desta enzima á insulina.

5.2. Genótipo-fenótipo-bioquímico Envolvidos na Progressão para a Doença Renal Crónica

5.2.1. Haptoglobina

A *Hp* é uma proteína de fase aguda que tem como uma das principais funções a ligação à hemoglobina livre (Hb) em circulação de modo a prevenir a perda de ferro e as lesões renais. Desta forma, a *Hp* previne a formação de espécies reactivas de oxigénio (ERO) livres que iniciam o stresse oxidante ¹²⁷. O complexo Hb-*Hp* é rapidamente eliminado da circulação sanguínea através da ligação a receptores específicos (CD163) de macrófagos. Assim, a *Hp* regula a resposta imune e a angiogénese através da ligação a outros receptores de leucócitos e ao CD163 ²¹⁵.

Os 3 fenótipos da *Hp* apresentam diferentes afinidades com a Hb livre. Está descrito na literatura que o fenótipo *Hp* 2.2 tem menor afinidade e menor eficácia na eliminação do complexo Hb-*Hp* devido ao maior tamanho da cadeia α , tornando-o um antioxidante mais fraco em relação aos outros fenótipos (1.1 e 2.1) ²¹⁶. No entanto, o fenótipo *Hp*

DISCUSSÃO

2.2 é o que apresenta a forma mais angiogénica, importante na reparação da isquémia dos tecidos ¹¹³.

O fenótipo 2.2. na literatura tem frequentemente associado a nefropatias, à DRC, à HTA, à DM ^{116,120}.

Relativamente ao papel da DMII na progressão para a doença renal crónica, o fenótipo *Hp* 2.2 revelou-se de risco para os indivíduos com DRT comparativamente ao indivíduos com DMII-DRC. Estes resultados são espectáveis devido ao papel antioxidantes da *Hp* e ao facto de o stresse ir aumentando à medida que a DRC avança. Os indivíduos com *Hp* 2.2 estão sujeitos a um maior stresse oxidante, uma vez que tem um tamanho e forma molecular distinto dos outros fenótipos. Estando a DPRAD, a DMII e a DRC associadas a um excesso de stresse oxidante e não tendo a *Hp* 2.2 capacidade para bloquear a actividade pró-oxidante da Hb livre e ligar-se a esta através dos receptores CD163 é normal que este fenótipo se apresente de risco para estas patologias ¹²⁶. A mesma justificação se aplica quando se verificou que o fenótipo *Hp* 2.2 foi de risco para os progressores rápidos em relação ao lentos, quando classificados com base no declive da creatinina. No entanto, o fenótipo 2.1 apresenta um OR de risco para a amostra de indivíduos com DMII-DRC em relação ao indivíduos com DMII. Este resultado vai contra o mecanismo patofisiológico que tem sido proposto para os indivíduos com DMII e com um aumento do declínio da função renal e que são portadores do fenótipo *Hp* 2.2, em que as células do túbulo proximal renal servem como um mecanismo padrão de depuração do complexo *Hp*-Hb, uma vez que, a depuração mediada por CD163 deste complexo é alterada nos indivíduos homozigóticos para o alelo 2 da *Hp*. As células do túbulo proximal renal são usadas para uma maior extensão, não conseguindo reduzir a perda de Hb através dos glomérulos, resultando no aumento da deposição de ferro, de stress oxidante, hipertrofia glomerular e lesões renais peroxidativas ²¹⁷.

No que diz respeito aos fenótipos de protecção, o *Hp* 2.1 foi associado à DRT em relação à DMII-DRC. O mesmo efeito protector verificou-se quando se compararam os indivíduos com pior prognóstico em relação ao com melhor, tendo como critério o declive da creatinina ao longo do tempo de seguimento. Estes resultados podem ser justificados pela heterose positiva, que é uma ocorrência nos polimorfismos humanos, em que o heterozigótico tem um efeito protector mais forte nas patologias. Este efeito pode ser atribuído ao aumento da versatilidade dos heterozigóticos, uma vez que têm maior eficiência na ligação Hb-*Hp* do que a *Hp* 2.2 ²¹³. Este efeito protector da *Hp* 2.1 foi verificado numa população iraniana com DMII ¹⁰⁶. O fenótipo *Hp* 2.2 foi de

protecção para os indivíduos com DMII-DRC. Este resultado não está de acordo com o que está descrito na literatura e não é espectável, uma vez que na patologia diabética com nefropatia o fenótipo *Hp* 2.2 tem sido amplamente associado ao risco e a uma progressão mais rápida para a DMII-DRC ¹⁰⁶, no entanto este resultado pode ser influenciado pela frequência dos indivíduos com o fenótipo em causa. Sendo que, das 3 formas a *Hp* 2.2 é a mais angiogénica, é importante referir que o aumento da concentração local de *Hp* nos processos crónicos de inflamação pode ser importante para a reparação tecidual provocada pela isquémia, devido ao seu papel de retenção de ferro que ajuda a inibir o crescimento celular e deprime o sistema imunitário ²¹⁸.

A *Hp* está envolvido na regulação da homeostase de ferro e nos níveis séricos de ferro. Estas diferenças estruturais conferem diferentes propriedades funcionais para as diferentes variantes da *Hp* ²¹³.

Os indivíduos com DPRAD tem os níveis de EPO mais elevados e níveis de Hb mais estáveis. A diminuição da formação de Epo leva a anemia e estas duas observações são muitas vezes verificadas em indivíduos com DMII e em indivíduos com nefropatia diabética ²¹⁹. A anemia pode estar associada a diversos factores como: deficiência de ferro por perda oculta de sangue, perda de produção de EPO; lesões no interstício renal, má absorção da vitamina B12, deficiência de folato, hemólise devido a microangiopatia ou a mecanismos imunes induzidos por drogas ou ainda devido a inflamação crónica. Na maior parte dos doentes anémicos existe uma relação inversa entre a Hb e os níveis séricos de EPO. No entanto, em indivíduos com DMII ou com anemia de doença crónica, os níveis de EPO são baixos, assim como os níveis de ferro e pelo contrário há um aumento dos níveis de ferritina ²²⁰.

A hepcidina é uma das principais causas de distúrbios no metabolismo do ferro em indivíduos com DRC e com anemia. Regula o equilíbrio de ferro sistémico devido à inflamação, infecção ou hipóxia, aumentando a sua expressão e diminuindo tanto a absorção intestinal de ferro como a libertação de ferro nos enterócitos, macrófagos e hepatócitos que conduzem à hipoferremia e limita a disponibilidade de ferro para eritropoiese. A resistência à eritropoietina na DRC pode ser causada por altas concentrações de hepcidina e ferro ²¹¹.

A hepcidina funciona como modulador de ferro e controla a expressão da ferroportina (o principal transportador de ferro) nos enterócitos e nos macrófagos diminuindo a disponibilidade para os macrófagos e limitando o ferro para a eritropoiese.

DISCUSSÃO

Em indivíduos com DRT os níveis séricos de ferritina estão aumentando, uma vez que se trata de uma doença inflamatória crónica e a hepcidina é induzida por inflamação (Interleucina-6 e TNF- α). Outra razão para o aumento da ferritina nos indivíduos com DRT em relação aos com DPRAD pode ser o facto de a hepcidina ter efeitos inibitórios sobre a eritropoiese afectando assim a proliferação dos precursores eritroides e a sua sobrevivência. A diminuição da depuração renal em pacientes com DRC aumenta a concentração sérica da hepcidina. Assim a hepcidina correlaciona-se negativamente com o ferro e com os níveis de Hb na DRC e de forma positiva com a ferritina ²²¹. No nosso estudo foi também possível associar um aumento dos níveis de ferritina dos indivíduos com DRT em relação aos com DPRAD independentemente do fenótipo da *Hp* (tabela 16.2).

A DRC é caracterizada por um estado pró-inflamatório. Os níveis da proteína C reactiva aumentam à medida que há um declínio na função renal, associado à anemia. As citocinas pró-inflamatórias actuam nas células progenitoras eritropoéticas de maneira oposta à EPO, ou seja, estimulam a apoptose. Este estado inflamatório da DRC provoca situações de resistência à acção medular da EPO e à terapêutica nos estádios mais avançados com EPO ²²².

Quando as concentrações intracelulares de ferro hemilo aumentam devido à endocitose do complexo com o fenótipo 2.2 da *Hp*, existe uma rápida indução da síntese de ferritina. Os níveis mais elevados de ferritina estão presentes nos indivíduos saudáveis com fenótipo *Hp* 2.2, provavelmente devido ao ferro libertado do hemilo que afecta a proteína regulatória de ferro (PRF) ou a conitase que regula a tradução do ARNm mensageiro da ferritina através da ligação ao elemento de resposta do ferro presente no ARNm mensageiro, aumentando os níveis de ferro retidos e armazenados pelo macrófago ²²³.

As diferenças nos níveis de ferro e de hemoglobina podem se explicar pelo modo de armazenamento de ferro dos portadores do fenótipo *Hp* 2-2, uma vez que este é o fenótipo que se liga de forma menos eficiente à Hb e que está associada a um aumento do processo inflamatório (Langlois & Delanghe, 1996). O fenótipo *Hp* 1.1 provavelmente devido ao seu tamanho e afinidade consegue migrar através da barreira do endotélio. Estas vantagens podem contribuir para uma depuração mais eficaz da hemoglobina livre a partir do plasma ²²⁴.

Na população com DRT observou-se que os indivíduos com o fenótipo da *Hp* 1.1 tinham valores mais elevados de ferro relativamente aos outros fenótipos²²⁵. O aumento dos níveis de ferro podem ser justificados pela toma de EPO uma vez que se encontram em TSFR. A influência do fenótipo da *Hp* pode ser explicado nesta patologia uma vez que existe falta de eficácia de EPO devido á resistência associada a indivíduos com DRT que fazem terapia com eritropoetina, tal como descrito por Costa et al.²¹¹. No entanto, quando se compararam as médias dos valores de ferro entre os indivíduos com DPRAD e DRT, verificou-se, como foi descrito na literatura e acima explicado um aumento do ferro sérico com significado estatístico nos indivíduos com fenótipo *Hp* 2.2 e com DRT.

As ERO estão envolvidas na etiologia e complicações cardiovasculares nos indivíduos com DM, incluindo a nefropatia a esta associada. O fenótipo da haptoglobina surge associado à progressão na doença diabética devido ao seu papel no sistema imunitário e como factor antioxidante.

A Hb-glicosilada interfere no desempenho da *Hp* no entanto, a alta afinidade da *Hp*-Hb não é afectada. A Hb-glicada é capaz de levar a cabo reacções oxidantes. Há um aumento da deposição de ferro nos indivíduos com DM. O ferro induz oxidação e esta acção é dependente de glicose e é acelerada no *status* diabético que recicla Fe^{3+} a Fe^{2+} , gerando potencial oxidante com formação de radical oxidrilo (reacção de Haber-Weiss). A sinergia entre a hiperglicemia e o ferro tem sido proposto para explicar a aceleração da progressão para a DCV em indivíduos com DMII-DRC²²⁶.

Nos indivíduos com DMII e DMII-DRC observa-se uma relação inversa entre o ferro e a ferritina (diminuição e aumento, respectivamente). Estas condições podem ser justificadas pela anemia de doença crónica. Na DMII-DRC existem estudos que acreditam que a EPO no soro pode reflectir a gravidade da doença (níveis de EPO mais baixos), uma vez que os baixos níveis de EPO podem reflectir as lesões intersticiais renais precoces que afectam as células productores de EPO e uma vez que, a anemia aparece muito precocemente nos indivíduos com DM com descida dos níveis de eritropoetina²³². Uma outra hipótese para a anemia nos doentes com DM é que a produção de EPO ser feita normalmente mas é catabolizada mais rapidamente devido à glicosilação não-enzimática. Na anemia de doença crónica, à aumento de citocinas e interleucinas que origina a supressão da proliferação de eritrócitos, inibindo a eritropoese e promovem a retenção do ferro no sistema mononuclear fagocitário²³³.

DISCUSSÃO

Desta forma é explicável porque razão os níveis de ferro estão mais baixos nos indivíduos com DMII-DRC e os níveis de ferritina estão mais elevados. No entanto estas diferenças só são significativas para o fenótipo *Hp* 2.1 no caso do ferro e nos fenótipos homozigóticos da *Hp* no caso da ferritina. No 1º caso a justificação para esta evidência poderá ser devido às características do alelo 2 da *Hp* já descritas em cima. Já os indivíduos com o fenótipo *Hp* 2.2, este aumento pode estar associado a um maior processo inflamatório uma vez que este é o fenótipo com menos protecção antioxidante e anti-inflamatória, logo têm menos saída de ferro dos macrófagos para os glóbulos vermelhos e inclusivamente poderão existir indivíduos deste grupo que já fazem suplementação com EPO e que poderão ter resistência a esta e, desta forma, aumentar os níveis de ferritina. No caso dos indivíduos com fenótipo 1.1, existe um aumento de ferritina, mas é menos elevado do que no caso dos indivíduos com fenótipo 2.2. Desta forma, o ferro é mais aproveitado mas pode continuar a existir alguma resistência á eritropoetina.

Já nos indivíduos com DPRAD e em relação á ferritina acontece o contrário, isto é, o fenótipo 1.1 é aquele que tem os valores de ferritina mais baixos em relação aos outros fenótipos, que pode ser justificado pelo maior aproveitamento do ferro para os glóbulos, visto que este é o fenótipo mais eficiente. Estas diferenças podem ser explicadas também pelas próprias patologias, uma vez que a DMII se trata de uma doença caracterizada por um estado pró-inflamatório, e este é agravado na DRC, afectando a produção de EPO e aumentando a sua resistência, sendo o armazenamento de ferro alterado. Já a DPRAD é uma doença monogénica autossómica dominante, onde há mais EPO e o ferro está a ser aproveitado, ou seja, há eritropoese eficaz.

A actividade da fosfatase ácida do eritrócito tem funções como: fosfotirosina fosfatase; flavina mononucleótido fosfatase ou fosfotirosina fosfotransferase estando envolvida na regulação do crescimento celular e do metabolismo energético. A fosforilação de tirosinas do domínio intracelular do receptor de insulina do eritrócito, que é um processo activado por agentes oxidantes poderá libertar algumas enzimas da via glicolítica das proteínas membranares onde estão ancorados por fosforilação activando a glicólise. Este processo é inibido pela FA ²¹⁴.

A baixa actividade da FA eritrocitária tem sido associada a um aumento para o risco de obesidade, influenciando o IMC devido à acção da fosfotirosina fosfatase através da modulação da taxa glicolítica, insulina e acção de factores de crescimento.

A DM é uma doença heterogénea em que existe dificuldade de secreção de insulina e/ou diferentes graus de resistência á insulina em resultado de anomalias metabólicas. Esta resistência pode resultar em defeitos que limitam a capacidade da insulina para actividades que influenciam várias enzimas, incluindo a proteína tirosina fosfatase (PTP). A actividade desta pode neutralizar a actividade da proteína tirosina cinase do receptor da insulina e desta forma ter um papel central na causa da resistência á insulina na diabetes tipo II. A autofosforilação do receptor da insulina diminui quando há resistência á insulina e está associada á activação da proteína tirosina fosfatase.

Foram observados aumentos da FA em pacientes com DMII-DRC associados ao fenótipo da *Hp* 2.2 que provavelmente estará relacionado com o controlo hormonal da FA e que poderá ter um papel na modulação do receptor da insulina por vias da fosforilação e inclusivamente relacionada com a resistência à insulina ²²⁹. O fenótipo 2.2 poderá estar também associado devido ao seu papel menos potente como antioxidante e ao processo inflamatório relacionado com a patologia (DM), fazendo o equilíbrio deslocar-se para uma resistência à insulina. Marques et al., observaram também um aumento de actividade da FA nos pacientes com DM ²²⁹.

No entanto quando a comparação foi feita entre grupos (grupo 1: DPRAD *versus* DMII, grupo 2: DPRAD *versus* DMII-DRC e grupo 3: DPRAD *versus* DRT) verificaram-se diferenças entre todos os grupos com um aumento de actividade da FA nos portadores do fenótipo *Hp* 1.1. A influência deste fenótipo pode ser explicado pela idade dos indivíduos, uma vez que se verificou que a idade era um factor independente de todos os outros e que os indivíduos com o fenótipo da *Hp* 1.1 eram mais idosos e a idade influencia a actividade da FA. Outra hipótese é a influência do polimorfismos da FA (ACP1) sobre a actividade, visto que, umas formas polimórficas podem ter mais actividade que outras ²¹⁴. Os indivíduos com DPRAD têm níveis significativamente mais elevados de FA do eritrócito independentemente do fenótipo quando comparados com os indivíduos com DMII e com DMII-DRC, continuando os indivíduos com o fenótipo homozigótico do alelo 1 a apresentar valores mais elevados de actividade da FA em relação aos outros fenótipos. Sendo que os indivíduos com DPRAD têm valores mais elevados de eritropoietina e que esta actua da mesma forma que a insulina (como um factor de crescimento para a eritropoiese), é normal que os níveis de FA estejam mais aumentados nesta população.

5.2.2. Glutathione-S-Transferase T1/M1

A actividade do GST tem um papel importante na protecção do ADN contra lesões, uma vez que se trata de uma enzima conjugadora de fase II envolvida na metabolização de xenobióticos⁸⁸. Os polimorfismos da GST resultam em diferentes actividades da enzima que podem resultar em stresse oxidante, através das alterações do metabolismo do glutathione²³⁰.

O genótipo não nulo da *GSTT1* foi de risco para as populações com DRT e para os indivíduos hipertensos com DPRAD. Os indivíduos com o genótipo não nulo parecem ser mais susceptíveis para hipertensão e para a DRT, uma vez que a actividade da GST resulta na formação de glutathione conjugado que é metabolizado pelo ácido mercaptúrico levando à depleção do GSH⁸⁸. No entanto pacientes submetidos a diálise com membranas de celulose, indicando que bioincompatibilidade na membrana, é um factor ambiental, contribui para um maior stresse oxidante¹⁴⁹. Também para o gene da *GSTM1* se verificou uma tendência de risco do genótipo não nulo para os indivíduos com HTA e com DPRAD que é explicado pelo mesmo fenómeno.

Já para o polimorfismo da *GSTM1* o genótipo nulo foi de risco para os indivíduos com DPRAD. Neste caso, o aumento de ERO associadas à patologia, assim como a diminuição da falta de actividade da GST poderam levar a lesões oxidativas mais intensas no ADN¹⁴⁰. Datta et al., verificaram que os indivíduos com DMII e com DRC tinham a um aumento do stress oxidante na presença do genótipo nulo, porque a variante nula do genótipo pode reduzir a expressão de GST levando a uma redução da defesa antioxidante e um baixo nível da GST, comparativamente aos pacientes com DRC¹⁴⁹.

Em relação aos genótipos de protecção, os resultados foram inversos, isto é, genótipo nulo da *GSTT1* para indivíduos com DRT e genótipo não nulo da *GSTM1* para a DPRAD. O genótipo nulo da *GSTT1* e *GSTM1* esteve associado à protecção dos indivíduos com DPRAD e HTA. Aplicam-se as mesmas justificação para os resultados obtidos.

No que diz respeito à progressão, os indivíduos com o genótipo nulo da *GSTT1* e que foram considerados progressores rápidos (tendo em conta o percentil em que se encontravam) tiveram uma tendência de risco. Estes resultados são justificados pelo

facto deste genótipo ter uma menor actividade antioxidante levando a mais lesões renais e a uma progressão mais rápida¹³⁸. Já a protecção para os indivíduos de progressão rápida esteve associada ao genótipo não nulo, pelas razões inversas em relação ao genótipo nulo.

No que concerne ao polimorfismo da *GSTM1*, os progressores mais rápidos tinham em maior frequência o genótipo não nulo. Neste caso, este resultado pode estar relacionado com um maior gasto do GSH e pode existir uma diminuição das defesas antioxidantes. Já o genótipo nulo foi de protecção provavelmente devido à capacidade de degradação de substâncias nefrotóxicas, produzidas no rim no decurso do crescimento dos quistos e ainda devido à capacidade de glutathionilação, que na ausência de GST regulam menos bem as enzimas dependentes do grupo SH²³¹.

No que concerne aos parâmetros bioquímicos estudados a RTM é uma enzima envolvida nos mecanismos anti-apoptóticos dependentes de energia e está associada a processos de envelhecimento celular e de controlo de stresse oxidante. A RTM está presente em todas as células, no entanto é no eritrócito que as actividades são mais elevadas, provavelmente porque não tem mitocôndrias. Alguns factores de crescimento como a insulina (IGF1), somatotrofina e eritropoietina, assim como agentes oxidantes extracelulares requerendo NADH, activam a RTM²¹⁴.

A RTM do eritrócito tem a actividade diminuída em indivíduos com DM e em crianças obesas e adultos e é independente de níveis plasmáticos de insulina e leptina. Nas fases precoces de obesidade não parece existir associação da resistência à insulina²³².

A RTM esteve aumentada nos indivíduos com DPRAD e com genótipo nulo para a *GSTM1*, uma vez que a enzima é activada pela EPO e tendo os indivíduos com DPRAD um maior produção de EPO devido à presença dos quistos é normal que este sistema enzimático esteja aumentado nos indivíduos com essa patologia. Visto que o genótipo nulo da *GSTM1* foi associado ao risco provavelmente por estar mais associado ao stress oxidante e o que leva a um aumento ainda maior da RTM. O mesmo é observado quando se comparou entre o grupos 2. Já quando se comparam, os genótipos da *GSTM1* com os diferentes grupos foram independentes do genótipo, onde nos grupos 2 e 3 existiram diferenças nos níveis de RTM, sendo mais elevada nos indivíduos com DPRAD que pode ser justificada pela presença de níveis mais elevados de EPO nos estádios iniciais da DRC, correspondente aos indivíduos com a

patologia na nossa população e ainda devo ao aumento do stress oxidante. O genótipo nulo da *GSTM1* manteve os valores mais elevados em relação ao genótipo não nulo. A razão pode estar relacionada com o risco deste genótipo para a patologia, como descrito em cima.

Marques et al., observaram que a actividade da RTM estava diminuída nos indivíduos com DMII em relação aos indivíduos sem a patologia e mostraram que a pH neutro ou ligeiramente alcalino a insulina não teve nenhum efeito estimulador sobre a RTM, uma vez que já estavam no máximo da actividade.

5.2.3. Metilenotetrahidrofolatoredutase

O polimorfismo C677T da *MTHFR* leva à alteração na posição 677 de uma citosina (C) a uma timina (T). Esta substituição de nucleótidos induz a substituição de uma alanina por uma valina. Os indivíduos homozigóticos para a mutação (genótipos TT), têm a enzima *MTHFR* mais termolábil e com menor afinidade para FADH₂, coenzimada da Hc. Em indivíduos com esta alteração os níveis de Hc estão aumentando em relação aos indivíduos heterozigóticos (genótipo CT) ou aos indivíduos homozigóticos sem mutação (genótipo CC) ¹⁵⁴. Devido à baixa actividade do genótipo TT, este tem sido associado à HTA, nefropatia diabética e DMII ¹⁶³ e às lesões causadoras de doença renal ¹⁷¹. Por outro lado, níveis elevados de homocisteína têm sido amplamente associados a estas patologias (Barbieri et al. 2015; Bloudícková et al. 2014; Dong et al. 2012; Qin et al. 2015) ^{171,173,233,235}.

De acordo com os resultados obtidos e, tal como foi descrito na literatura ^{163,165,236} o genótipo TT da *MTHFR* foi de risco na DMII-DRC e nos indivíduos nos estádios 4 e 5 com DMII-DRC comparativamente com a amostra de indivíduos com DMII. Primeiramente, poderá associar-se à acumulação de homocisteína devido à reduzida actividade da *MTHFR*, que impede a transferência de grupos metilo da 5-MTHF para a homocisteína interferindo na remetilação de homocisteína em metionina catalisada pela metionina sintetase ⁹³. No entanto, o eixo é invertido pela produção de purinas pela 5,10-MTHF contribuindo para o crescimento celular. Por outro lado, quando o processo inflamatório está muito ativo, como na DRC e na DMII, a presença do genótipo TT da *MTHFR* possibilita a conversão da serina em glicina, sendo esta aproveitada pelas células inflamatórias contribuindo para a proliferação celular. Ainda de acrescentar que num processo inflamatório activo verifica-se consumo de FAD associado à *MTHFR* pela via da redução de GSH ²³⁸.

O genótipo CC da *MTHFR*, foi de risco nos indivíduos com DRT. Apesar de o genótipo CC da *MTHFR* poder contribuir para a não acumulação de homocisteína favorecendo a formação de SAM e, conseqüentemente, reações de metilação no ADN, ARN, proteínas, entre outros ²³⁷; elevadas concentrações de SAM inibem a *MTHFR* que diminui a síntese de 5-MTHF e remetilação da homocisteína ²³⁹.

Por outro lado, o genótipo CT da *MTHFR* foi protetor tanto nos indivíduos com DRT como nos indivíduos com DPRAD e com DRC. Esta associação pode ser explicada por um fenómeno de heterose positiva²⁴⁰, que na *MTHFR* poderá estar relacionada com um equilíbrio entre a metilação, a formação de purinas para a síntese de ADN e consequente desenvolvimento celular e ainda uma expressão intermédia de enzimas antioxidantes ¹⁵². Estes papéis parecem ser importantes uma vez que estamos a falar de patologias ligadas a stress oxidante e a lesões nos órgãos.

Não se observaram associações entre o genótipo da *MTHFR* e os diferentes tipos de progressores da DRC, no entanto, o polimorfismo da *MTHFR* está muito relacionado com a alimentação e este pode ser um dos motivos para a não associação.

Na interação entre genótipo e os parâmetros bioquímicos, foi observado um aumento da RTM nos indivíduos com genótipo TT com DMII-DRC, que apesar de terem baixo nível de EPO que leva a uma diminuição da RTM, o genótipo TT da *MTHFR* é aquele que está associado a mais stress oxidante e estando a RTM relacionada com o stress oxidante, esta pode aumentar neste genótipo devido às suas características. Quando se compararam entre os grupos (2 e 3) verificou-se que os outros genótipos (CC e CT) tinham os valores mais baixos em relação aos indivíduos com DPRAD, relacionados com a EPO e com a actividade da enzima *MTHFR*.

5.2.4. Cistationa- β -Sintetase

A *C β S* é activada alostéricamente por grupos dadores de metilo (SAM). O genótipo ins/ins tal como descrito em outras populações, também na nossa amostra foi muito raro ⁸⁶.

O genótipo heterozigótico (ins/del) apresentou uma associação de risco com os indivíduos com DMII, com DMII-DRC, DMII-DRC em estádios avançados. No entanto, o efeito da *C β S* nos indivíduos com DRT, assim como para os que têm progressão

DISCUSSÃO

rápida (declive da creatinina), o genótipo del/del é associado ao risco. Na literatura o genótipo del/del está associada ao risco uma vez que tem menor actividade da enzima CBS¹⁵⁰ e que, devido a esta alteração na actividade, há uma diminuição da H₂S e do glutathione e um aumento da Hc que assim, aumentam a libertação de citocinas e aumentam a inflamação¹⁸⁹. Contudo, o genótipo ins/del pode estar associado com o risco porque os indivíduos com este genótipo consomem mais Hc e pode não existir uma regulação da expressão genética.

O efeito inverso é observado para a protecção. O papel de protecção de ins/del está descrito na literatura devido à sua maior actividade e a uma melhor regulação dos enzimas antioxidantes e de inflamação¹⁵⁰ e foi associado à DRT e aos progressores rápidos quando caracterizados pelo declive da creatinina.

CONCLUSÃO

6. CONCLUSÃO

A DPRAD e a DMII são duas doenças que se comportam de forma extrema em relação à produção de eritropoetina; uma tem um aumento devido à presença dos quistos e outra tem uma diminuição nas fases iniciais da doença. Quanto à DMII-DRC e à DRT, estas estão associadas a uma resistência à eritropoetina.

O polimorfismo da *GSTM1* esteve associado à DPRAD, com o genótipo não nulo a surgir como protector e o nulo como risco. Verificou-se que o genótipo não nulo dos polimorfismos da *GSTM1* e da *GSTT1* estiveram relacionados com a presença de hipertensão arterial nos indivíduos com DPRAD.

O polimorfismo da *Hp*, da *GSTT1*, *GSTM1* e da *CβS* estiveram relacionadas com a progressão para a DRC nos indivíduos com DPRAD, tanto pelo declive de creatinina ou refletida pela equação de Cockcroft-Gault, ao longo dos meses de follow-up, ou seja, estes polimorfismos influenciaram a velocidade das lesões renais à medida que os indivíduos vão progredindo na DRC até a DRT.

Observou-se que os indivíduos com DRT e com DMII-DRC, para quase todos os polimorfismos estudados, apresentaram comportamentos de susceptibilidade diferentes, o que poderá levar a inferir que a progressão nas diversas fases nestas duas amostras populacionais é distinta.

Tal como seria de esperar, a idade esteve significativamente associada às patologias estudadas, tendo reflectido diferenças de resposta em alguns parâmetros bioquímicos em cada grupo analisado e em termos de etiologia.

A eritropoetina poderá estar relacionada com as alterações do metabolismo do ferro reflectidas nos níveis de ferro plasmático, de ferritina e de actividade de enzimas do eritrócito como a FA e a RTM. O estado inflamatório associado à DMII e à DRT, poderá incrementar a gravidade associada a estas patologias. De facto, observaram-se diferenças em relação aos níveis de ferritina entre os indivíduos com DPRAD (valores mais baixos) e as restantes patologias, para todos os polimorfismos estudados, podendo estas diferenças estar associadas ao estado inflamatório da DMII, DMII-DRC e DRT. O comportamento da FA, que foi independente dos polimorfismos estudados entre os indivíduos com DMII e DMII-DRC em relação aos com DPRAD e DRT, poderá estar relacionada com a resposta à insulina.

CONCLUSÃO

E por último, os níveis elevados da RTM, nos indivíduos com DPRAD em relação às outras doenças estudadas, poderá reflectir o papel da eritropoetina, o aumento da hepcidina e aumento da homocisteína.

Prespectivas futuras: São importante mais estudos para perceber melhor o contributo de genes relacionados com o stresse oxidante de forma a se poder identificar precocemente indivíduos com propensão para a DRT. A *Hp* poderá ter um contributo como biomarcador da função renal na urina tanto em indivíduos com DPRAD, como em indivíduos com DMII. O papel da eritropoetina e da hepcidina pode ser também estudado nas populações que têm mais propensão para a progressão na DRC. Assim, um dos principais interesses deste estudo poderá ser o desenvolvimento de novos biomarcadores.

REFERÊNCIAS

7. REFERÊNCIAS

- 1 Taal MW, Chertow GM, Brenner BM, Marsden PA, Skorecki K. *The Kidney*. 9^a ed. Elsevier Saunders: Philadelphia, 2012.
- 2 Long DL, Fauci AS, Kasper DL, Hauser SL, Jameson JL, Loscalzo J. Disorders of the Kidney and Urinary Tract. In: *Harrison's Principles of Internal Medicine*. 2013, pp 2280–2401.
- 3 Barger, A.C. and Herd JA. The Renal Circulation. *N Engl J Med* 1971; **284**: 482–490.
- 4 Reilly RF., Perazella MA. *NEPHROLOGY IN 30 DAYS*. 1^a ed. McGraw-Hill: New York, 2005.
- 5 Brewster UC, Perazella MA. The renin-angiotensin-aldosterone system and the kidney: Effects on kidney disease. *Am J Med* 2004; **116**: 263–272.
- 6 Tojo Y, Sekine H, Hirano I, Pan X, Souma T, Tsujita T *et al*. Hypoxia Signaling Cascade for Erythropoietin Production in Hepatocytes. *Mol Cell Biol* 2015; **35**: 2658–2672.
- 7 Buchholz B, Schley G, Faria D, Kroening S, Willam C, Schreiber R *et al*. Hypoxia-Inducible Factor-1 α Causes Renal Cyst Expansion through Calcium-Activated Chloride Secretion. *J Am Soc Nephrol* 2014; **25**: 465–474.
- 8 Marre M, Jeunemaitre X, Gallois Y, Rodier M, Chatellier G, Sert C *et al*. Contribution of genetic polymorphism in the renin-angiotensin system to the development of renal complications in insulin-dependent diabetes. Genetique de la Nephropathie Diabetique (GENEDIAB) study group. *J Clin Invest* 1997; **99**: 1585–1595.
- 9 Guasch a., Deen WM, Myers BD. Charge selectivity of the glomerular filtration barrier in healthy and nephrotic humans. *J Clin Invest* 1993; **92**: 2274–2282.
- 10 Riella MC. *Princípios de Nefrologia e Distúrbios Hidroeletrólíticos*. 5^a ed. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 2010.
- 11 Lin Y-C, Bansal N, Vittinghoff E, Go AS, Hsu C-Y. Correction: Determinants of the creatinine clearance to glomerular filtration rate ratio in patients with chronic kidney disease: a cross-sectional study. *BMC Nephrol* 2013; **14**: 268.
- 12 Levey AS, de Jong PE, Coresh J, El Nahas M, Astor BC, Matsushita K *et al*. The definition, classification, and prognosis of chronic kidney disease: a KDIGO Controversies Conference report. *Kidney Int* 2011; **80**: 17–28.
- 13 Martínez-Castelao A, Górriz-Teruel JL, Bover-Sanjuán J, Segura-de la Morena J, Cebollada J, Escalada J *et al*. Consensus document for the detection and management of chronic kidney disease. *Nefrologia* 2014; **34**: 243–262.
- 14 Goldsmith D., Jayawardene S., Ackland P. *ABC of Kidney Disease*. 2007.

REFERÊNCIAS

- 15 Levey AS, Stevens L a, Schmid CH, Zhang YL, Castro AF, Feldman HI *et al.* A new equation to estimate glomerular filtration rate. *Ann Intern Med* 2009; **150**: 604–612.
- 16 Harris PC, Rossetti S. Molecular diagnostics for autosomal dominant polycystic kidney disease. *Nat Rev Nephrol* 2010; **6**: 197–206.
- 17 Woo D. Apoptosis and loss of renal tissue in polycystic kidney diseases. *N Engl J Med* 1995; **333**: 18–25.
- 18 Torres VE, Harris PC. Mechanisms of Disease: autosomal dominant and recessive polycystic kidney diseases. *Nat Clin Pract Nephrol* 2006; **2**: 40–55; quiz 55.
- 19 Chapman AB, Stepniakowski K, Rahbari-Oskoui F. Hypertension in Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease. *Adv Chronic Kidney Dis* 2010; **17**: 153–163.
- 20 Torres V, Harris P. Autosomal dominant polycystic kidney disease: the last 3 years. *Kidney Int* 2009; **76**: 149–168.
- 21 Niemczyk M, Pilecki T, Gradzik M, Bujko M, Niemczyk S, Paczek L. Blood Pressure and Intracranial Aneurysms in Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease. *Kidney Blood Press Res* 2014; **39**: 630–635.
- 22 Almeida EA De, Lopes JA, Prata MM, Costa AG. Progression of Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease : A Follow-Up Study of a Large Cohort in a Single Center. In: Kruger E, Hahn K (eds). *Nephrology Dialysis Transplantation*. 2009, pp 1–15.
- 23 Alam A, Dahl NK, Lipschutz JH, Rossetti S, Smith P, Sapir D *et al.* Total Kidney Volume in Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease: A Biomarker of Disease Progression and Therapeutic Efficacy. *Am J Kidney Dis* 2015; **66**: 564–576.
- 24 Meijer E, Rook M, Tent H, Navis G, van der Jagt EJ, de Jong PE *et al.* Early renal abnormalities in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Clin J Am Soc Nephrol* 2010; **5**: 1091–1098.
- 25 Chapman, AB, Johnson a M, Gabow P a, Schrier RW. Overt proteinuria and microalbuminuria in autosomal dominant polycystic kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 1994; **5**: 1349–1354.
- 26 Blanchette CM, Roy D. End-stage renal disease in autosomal dominant polycystic kidney disease : a comparison of dialysis-related utilization and costs with other chronic kidney diseases. *Clin Outcomes Res* 2015; **7**: 65–72.
- 27 Saigusa T, Dang Y, Bunni M a., Amria MY, Steele SL, Fitzgibbon WR *et al.* Activation of the intrarenal renin-angiotensin-system in murine polycystic kidney disease. *Physiol Rep* 2015; **3**: e12405–e12405.
- 28 Chapman AB, Devuyst O, Eckardt K-U, Gansevoort RT, Harris T, Horie S *et al.* Autosomal-dominant polycystic kidney disease (ADPKD): executive summary

- from a Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) Controversies Conference. *Kidney Int* 2015; **88**: 17–27.
- 29 Grantham JJ, Mulamalla S, Swenson-Fields KI. Why kidneys fail in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Nat Rev Nephrol* 2011; **7**: 556–566.
 - 30 Paul BM, Vanden Heuvel GB. Kidney: polycystic kidney disease. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol* 2014; **3**: 465–487.
 - 31 Helal I, Fick-Brosnahan GM, Reed-Gitomer B, Schrier RW. Glomerular hyperfiltration: definitions, mechanisms and clinical implications. *Nat Rev Nephrol* 2012; **8**: 293–300.
 - 32 Harris PC, Rossetti S. Determinants of Renal Disease Variability in ADPKD. *Adv Chronic Kidney Dis* 2010; **17**: 131–139.
 - 33 Spithoven EM, Kramer a., Meijer E, Orskov B, Wanner C, Abad JM *et al.* Renal replacement therapy for autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD) in Europe: prevalence and survival--an analysis of data from the ERA-EDTA Registry. *Nephrol Dial Transplant* 2014; **29**: iv15–iv25.
 - 34 Rahbari-Oskoui F, Williams O, Chapman A. Mechanisms and management of hypertension in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Nephrol Dial Transplant* 2014; : 1–8.
 - 35 De Almeida E, Sousa A, Pires C, Aniceto J, Barros S, Prata MM. Prevalence of autosomal- dominant polycystic kidney disease in Alentejo, Portugal. *Kidney Int* 2001; **59**: 2374.
 - 36 Leuenroth SJ, Bencivenga N, Chahboune H, Hyder F, Crews CM. Triptolide reduces cyst formation in a neonatal to adult transition Pkd1 model of ADPKD. *Nephrol Dial Transplant* 2010; **25**: 2187–2194.
 - 37 Caroli A, Perico N, Perna A, Antiga L, Brambilla P, Pisani A *et al.* Effect of longacting somatostatin analogue on kidney and cyst growth in autosomal dominant polycystic kidney disease (ALADIN): A randomised, placebo-controlled, multicentre trial. *Lancet* 2013; **382**: 1485–1495.
 - 38 Saigusa T, Bell PD. Molecular Pathways and Therapies in Autosomal-Dominant Polycystic Kidney Disease. *Physiology* 2015; **30**: 195–207.
 - 39 Torres VE, Harris PC. Autosomal dominant polycystic kidney disease: the last 3 years. *Kidney Int* 2009; **76**: 149–168.
 - 40 Pei Y, Watnick T. Diagnosis and Screening of Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease. *Adv Chronic Kidney Dis* 2010; **17**: 140–152.
 - 41 Pietrzak-Nowacka M, Safranow K, Palacz J, Gołembiewska E, Marchelek-Myśliwiec M, Ciechanowski K. Association of kidney and cysts dimensions with anthropometric and biochemical parameters in patients with ADPKD. *Ren Fail* 2015; **6049**: 1–6.

REFERÊNCIAS

- 42 Pei Y, Lan Z, Wang K, Garcia-Gonzalez M, He N, Dicks E *et al.* A missense mutation in PKD1 attenuates the severity of renal disease. *Kidney Int* 2012; **81**: 412–417.
- 43 Huang E, Samaniego-picota M, Mccune T, Melancon JK, Montgomery R a, Ugarte R *et al.* NIH Public Access. 2009; **87**: 133–137.
- 44 Schrier RW, Brosnahan G, Cadnapaphornchai M a, Chonchol M, Friend K, Gitomer B *et al.* Predictors of Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease Progression. *J Am Soc Nephrol* 2014; **25**: 2399–2418.
- 45 Menezes LF, Germino GG. Systems biology of polycystic kidney disease: a critical review. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med* 2015; **7**: 39–52.
- 46 Cnossen WR, te Morsche RH, Hoischen A, Gilissen C, Venselaar H, Mehdi S *et al.* LRP5 variants may contribute to ADPKD. *Eur J Hum Genet* 2015; 1–6.
- 47 Pei Y, Hwang Y-H, Conklin J, Sundsbak JL, Heyer CM, Chan W *et al.* Imaging-Based Diagnosis of Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease. *J Am Soc Nephrol* 2015; **26**: 746–753.
- 48 Paul BM, Consugar MB, Ryan Lee M, Sundsbak JL, Heyer CM, Rossetti S *et al.* Evidence of a third ADPKD locus is not supported by re-analysis of designated PKD3 families. *Kidney Int* 2014; **85**: 383–92.
- 49 Edelstein CL. Mammalian target of rapamycin and caspase inhibitors in polycystic kidney disease. *Clin J Am Soc Nephrol* 2008; **3**: 1219–1226.
- 50 Boor P, Ostendorf T, Floege J. Renal fibrosis: novel insights into mechanisms and therapeutic targets. *Nat Rev Nephrol* 2010; **6**: 643–656.
- 51 Torra R, Badenas C, Pérez-Oller L, Luis J, Millán S, Nicolau C *et al.* Increased prevalence of polycystic kidney disease type 2 among elderly polycystic patients. *Am J Kidney Dis* 2000; **36**: 728–734.
- 52 Sullivan LP, Wallace DP, Grantham JJ. Epithelial transport in polycystic kidney disease. *Physiol Rev* 1998; **78**: 1165–1191.
- 53 Eccles MR, Stayner C a. Polycystic kidney disease - where gene dosage counts. *F1000Prime Rep* 2014; **6**: 24.
- 54 Gabow P a, Johnson a M, Kaehny WD, Kimberling WJ, Lezotte DC, Duley IT *et al.* Factors affecting the progression of renal disease in autosomal-dominant polycystic kidney disease. *Kidney Int* 1992; **41**: 1311–1319.
- 55 Cornec-Le Gall E, Audrézet M-P, Chen J-M, Hourmant M, Morin M-P, Perrichot R *et al.* Type of PKD1 mutation influences renal outcome in ADPKD. *J Am Soc Nephrol* 2013; **24**: 1006–13.
- 56 Choukroun G, Itakura V, Albouze G, Christophe J-L, Man N, Grunfeld JP *et al.* Factors Influencing Progression of Renal Failure in Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease. *J Am Soc Nephrol* 1995; **6**: 1634–1642.

- 57 De Almeida E a F, Prata MM. Hypertension in autosomal dominant polycystic kidney disease: observational study in 207 patients with a mean follow-up of 107 months. *Rev Port Cardiol* 2007; **26**: 1173–1182.
- 58 Klahr S, Breyer J a, Beck GJ, Dennis VW, Hartman J a, Roth D *et al.* Dietary protein restriction, blood pressure control, and the progression of polycystic kidney disease. Modification of Diet in Renal Disease Study Group. *J Am Soc Nephrol* 1995; **5**: 2037–2047.
- 59 Harris RC, Neilson EG. Toward a unified theory of renal progression. *Annu Rev Med* 2006; **57**: 365–380.
- 60 Iglesias J, Levine JS. Albuminuria and renal injury--beware of proteins bearing gifts. *Nephrol Dial Transplant* 2001; **16**: 215–218.
- 61 Wa TCLK, Macnicol a. M, Watson ML. Ambulatory blood pressure in hypertensive patients with autosomal dominant polycystic kidney disease. *Nephrol Dial Transplant* 1997; **12**: 2075–2080.
- 62 Raptis V, Georgianos PI, Sarafdis P a., Sioulis A, Makedou K, Makedou A *et al.* Elevated Asymmetric Dimethylarginine is Associated With Oxidant Stress Aggravation in Patients With Early Stage Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease. *Kidney Blood Press Res* 2013; **38**: 72–82.
- 63 Ecder T, Schrier RW. Cardiovascular abnormalities in autosomal-dominant polycystic kidney disease. *Nat Rev Nephrol* 2009; **5**: 221–228.
- 64 Fonseca JM, Bastos AP, Amaral AG, Sousa MF, Souza LE, Malheiros DM *et al.* Renal cyst growth is the main determinant for hypertension and concentrating deficit in Pkd1-deficient mice. *Kidney Int* 2014; **85**: 1137–50.
- 65 Loghman-Adham M, Soto CE, Inagami T, Cassis L. The intrarenal renin-angiotensin system in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Am J Physiol Renal Physiol* 2004; **287**: F775–F788.
- 66 Torres VE, Harris PC, Pirson Y. Autosomal dominant polycystic kidney disease. *Lancet* 2007; **369**: 1287–1301.
- 67 Antignac C, Calvet JP, Germino GG, Grantham JJ, Guay-Woodford LM, Harris PC *et al.* The Future of Polycystic Kidney Disease Research--As Seen By the 12 Kaplan Awardees. *J Am Soc Nephrol* 2015; 1–15.
- 68 Gul CB, Yildiz A, Ersoy A, Kahvecioglu S, Asiltas B, Yildirim F *et al.* Correlation between arterial stiffness and inflammatory markers in autosomal dominant polycystic kidney disease patients with preserved renal function. *Int Urol Nephrol* 2015; **47**: 1187–1194.
- 69 Pietrzak-Nowacka M, Safranow K, Czechowska M, Dutkiewicz G, Kornacewicz-Jach Z, Ciechanowski K. Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease and Hypertension are Associated with Left Ventricular Mass in a Gender-Dependent Manner. *Kidney Blood Press Res* 2012; **36**: 301–309.

REFERÊNCIAS

- 70 Pietrzak-Nowacka M, Safranow K, Bober J, Olszewska M, Birkenfeld B, Nowosiad M *et al.* Calcium-phosphate metabolism parameters and erythrocyte Ca²⁺ concentration in autosomal dominant polycystic kidney disease patients with normal renal function. *Arch Med Sci* 2013; **5**: 837–842.
- 71 Kocaman O, Oflaz H, Yekeler E, Dursun M, Erdogan D, Demirel S *et al.* Endothelial Dysfunction and Increased Carotid Intima-Media Thickness in Patients with Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease. *Am J Kidney Dis* 2004; **43**: 854–860.
- 72 Wang D, Strandgaard S, Borresen ML, Luo Z, Connors SG, Yan Q *et al.* Asymmetric dimethylarginine and lipid peroxidation products in early autosomal dominant polycystic kidney disease. *Am J Kidney Dis* 2008; **51**: 184–191.
- 73 Wu CC, Zheng CM, Lin YF, Lo L, Liao MT, Lu KC. Role of homocysteine in end-stage renal disease. *Clin Biochem* 2012; **45**: 1286–1294.
- 74 El-Mesallamy H, Suwailem S, Hamdy N. Evaluation of C-reactive protein, endothelin-1, adhesion molecule(s), and lipids as inflammatory markers in type 2 diabetes mellitus patients. *Mediators Inflamm* 2007; **2007**.
- 75 Mao S, Xiang W, Huang S, Zhang A. Association between homocysteine status and the risk of nephropathy in type 2 diabetes mellitus. *Clin Chim Acta* 2014; **431**: 206–210.
- 76 Ekart R, Ferjuc A, Furman B, Gerjevič Š, Bevc S, Hojs R. Chronic Kidney Disease Progression to End Stage Renal Disease: A Single Center Experience of the Role of the Underlying Kidney Disease. *Ther Apher Dial* 2013; **17**: 363–367.
- 77 De Nicola L, Provenzano M, Chiodini P, Borrelli S, Garofalo C, Pacilio M *et al.* Independent Role of Underlying Kidney Disease on Renal Prognosis of Patients with Chronic Kidney Disease under Nephrology Care. *PLoS One* 2015; **10**: e0127071.
- 78 Nannieperi M, Rizzo L, Rapuano A, Pilo A, Penno G, Navalesi R. Increased Transcapillary Escape Rate of Albumin in Microalbuminuric Type II Diabetic Patients. *Diabetes Care* 1995; **18**: 1-9.
- 79 Grantham JJ. Lillian Jean Kaplan International Prize for Advancement in the Understanding of Polycystic Kidney Disease - Understanding polycystic kidney disease: A systems biology approach. *Kidney Int* 2003; **64**: 1157–1162.
- 80 Helal I, Reed B, Schrier RW. Emergent early markers of renal progression in autosomal-dominant polycystic kidney disease patients: Implications for prevention and treatment. *Am J Nephrol* 2012; **36**: 162–167.
- 81 Finkelstein JD. The metabolism of homocysteine: pathways and regulation. *Eur J Pediatr* 1998; **157 Suppl** : S40–S44.
- 82 Brosnan JT. Homocysteine and cardiovascular disease: interactions between nutrition, genetics and lifestyle. *Can J Appl Physiol* 2004; **29**: 773–780.

- 83 Varga EA, Sturm AC, Misita CP, Moll S. Cardiology patient pages. Homocysteine and MTHFR mutations: relation to thrombosis and coronary artery disease. *Circulation* 2005; **111**: e289–e293.
- 84 Hultberg B, Andersson a., Isaksson a. Metabolism of homocysteine, its relation to the other cellular thiols and its mechanism of cell damage in a cell culture line (human histiocytic cell line U-937). *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res* 1995; **1269**: 6–12.
- 85 Brosnan JT, Jacobs RL, Stead LM, Brosnan ME. Methylation demand: A key determinant of homocysteine metabolism. *Acta Biochim Pol* 2004; **51**: 405–413.
- 86 Yakub M, Moti N, Parveen S, Chaudhry B, Azam I, Iqbal MP. Polymorphisms in MTHFR, MS and CBS genes and homocysteine levels in a Pakistani population. *PLoS One* 2012; **7**: 1–7.
- 87 Silberberg J, Crooks R, Fryer J, Wlodarczyk J, Nair B, Guo XW *et al.* Gender differences and other determinants of the rise in plasma homocysteine after L-methionine loading. *Atherosclerosis* 1997; **133**: 105–110.
- 88 Marinho C, Alho I, Arduíno D, Falcão LM, Brás-Nogueira J, Bicho M. GST M1/T1 and MTHFR polymorphisms as risk factors for hypertension. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; **353**: 344–350.
- 89 Trabetti E. Homocysteine, MTHFR gene polymorphisms, and cardio-cerebrovascular risk. *J Appl Genet* 2008; **49**: 267–282.
- 90 Durand P, Prost M, Loreau N, Lussier-Cacan S, Blache D. Impaired homocysteine metabolism and atherothrombotic disease. *Lab Invest* 2001; **81**: 645–672.
- 91 Nerbass FB, Draibe S a., Feiten SF, Chiarello PG, Vannucchi H, Cuppari L. Homocysteine and its determinants in nondialyzed chronic kidney disease patients. *J Am Diet Assoc* 2006; **106**: 267–270.
- 92 Aléssio ACM, Siqueira LH, Bydlowski SP, Höehr NF, Annichino-Bizzacchi JM. Polymorphisms in the CBS gene and homocysteine, folate and vitamin B 12 levels: Association with polymorphisms in the MTHFR and MTRR genes in Brazilian children. *Am J Med Genet Part A* 2008; **146**: 2598–2602.
- 93 Olivieri O, Friso S, Trabetti E, Girelli D, Pizzolo F, Faccini G *et al.* Homocysteine and atheromatous renal artery stenosis. *Clin Exp Med* 2001; **1**: 211–218.
- 94 Van Guldener C, Nanayakkara PWB, Stehouwer CD a. Homocysteine and asymmetric dimethylarginine (ADMA): Biochemically linked but differently related to vascular disease in chronic kidney disease. *Clin Chem Lab Med* 2007; **45**: 1683–1687.
- 95 Durmaz A, Dikmen N. Homocysteine effects on cellular glutathione peroxidase (GPx-1) activity under in vitro conditions. *J Enzyme Inhib Med Chem* 2007; **22**: 733–738.

REFERÊNCIAS

- 96 Coppola S, Ghibelli L. GSH extrusion and and the mitochondrial pathway of apoptotic signalling. *Biochem Soc Trans* 2000; **28**: 56–61.
- 97 Tsai J-C, Perrella M a., Yoshizumi M, Hsieh C-M, Haber E, Schlegel R *et al.* Promotion of vascular smooth muscle cell growth by homocysteine: a link to atherosclerosis. *Pnas* 1994; **91**: 6369–6373.
- 98 Von Eckardstein A, Malinow MR, Upson B, Heinrich J, Schulte H, Schonfeld R *et al.* Effects of age, lipoproteins, and hemostatic parameters on the role of homocyst(e)inemia as a cardiovascular risk factor in men. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1994; **14**: 460–464.
- 99 Lentz SR, Haynes WG. Homocysteine: Is it a clinically important cardiovascular risk factor? *Cleve Clin J Med* 2004; **71**: 729–734.
- 100 De Franchis R, Fermo I, Mazzola G, Sebastio G, Di Minno G, Coppola A *et al.* Contribution of the cystathionine β -synthase gene (844ins68) polymorphism to the risk of early-onset venous and arterial occlusive disease and of fasting hyperhomocysteinemia. *Thromb Haemost* 2000; **84**: 576–582.
- 101 Saifan C, Samarneh M, Shtaynberg N, Nasr R, El-Charabaty E, El-Sayegh S. Treatment of confirmed B12 deficiency in hemodialysis patients improves Epgen?? requirements. *Int J Nephrol Renovasc Dis* 2013; **6**: 89–93.
- 102 Iqbal N, Azar D, Yun Y, Ghausi O, Ix J, Fitzgerald RL. Serum Methylmalonic Acid and Holotranscobalamin-II as Markers for Vitamin B12 Deficiency in End-Stage Renal Disease Patients. 2013; **43**: 243–249.
- 103 Ouyang F, Christoffel KK, Brickman WJ, Zimmerman D, Wang B, Xing H *et al.* Adiposity is inversely related to insulin sensitivity in relatively lean Chinese adolescents: A population-based twin study. *Am J Clin Nutr* 2010; **91**: 662–671.
- 104 Hultberg B, Andersson A, Isaksson A. Metabolism of homocysteine, its relation to the other cellular thiols and its mechanism of cell damage in a cell culture line (human histiocytic cell line U-937). *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res* 1995; **1269**: 6–12.
- 105 Langlois MR, Delanghe JR, De Buyzere ML, Bernard DR, Ouyang J. Effect of haptoglobin on the metabolism of vitamin C. *Am J Clin Nutr* 1997; **66**: 606–610.
- 106 Amiri AA, Hashemi-Soteh MB, Haghshenas MR, Daneshvar F, Rastegar A, Farazmand T. Haptoglobin polymorphism in individuals with type 2 diabetic microangiopathy. *N Am J Med Sci* 2013; **5**: 529–535.
- 107 Raugei G, Bensi G, Colantuoni V, Romano V, Santoro C, Costanzo F *et al.* Sequence of human haptoglobin cDNA:evidence that the α and β subunits are coded by the same mRNA. *Nucleic Acids Res* 1983; **11**: 5811–5819.
- 108 Maeda N. Nucleotide sequence of the haptoglobin and haptoglobin-related gene pair. *J Biol Chem* 1985; **260**: 6698–6709.

- 109 Marinković S, Baumann H. Structure, hormonal regulation, and identification of the interleukin-6- and dexamethasone-responsive element of the rat haptoglobin gene. *Mol Cell Biol* 1990; **10**: 1573–1583.
- 110 Guetta J, Strauss M, Levy NS, Fahoum L, Levy AP. Haptoglobin genotype modulates the balance of Th1/Th2 cytokines produced by macrophages exposed to free hemoglobin. *Atherosclerosis* 2007; **191**: 48–53.
- 111 Berkova N, Gilbert C, Goupil S, Yan J, Korobko V, Naccache PH. TNF-induced haptoglobin release from human neutrophils: pivotal role of the TNF p55 receptor. *J Immunol* 1999; **162**: 6226–6232.
- 112 Rossbacher J, Wagner L, Pasternack MS. Inhibitory effect of haptoglobin on granulocyte chemotaxis, phagocytosis and bactericidal activity. *Scand J Immunol* 1999; **50**: 399–404.
- 113 Cid MC, Grant DS, Hoffman GS, Auerbach R, Fauci a S, Kleinman HK. Identification of haptoglobin as an angiogenic factor in sera from patients with systemic vasculitis. *J Clin Invest* 1993; **91**: 977–985.
- 114 Cheng Z, Yang X, Wang H. Hyperhomocysteinemia and Endothelial Dysfunction. *Curr Hypertens Rev* 2009; **5**: 158–165.
- 115 Burbea Z, Nakhoul F, Zoabi R, Hochberg I, Levy NS, Benchetrit S *et al.* Haptoglobin phenotype as a predictive factor of mortality in diabetic haemodialysis patients. *Ann Clin Biochem* 2004; **41**: 469–473.
- 116 Armaly Z, El Qader AA, Jabbour A, Hassan K, Ramadan R, Bowirrat A *et al.* Effects of carnitine on oxidative stress response to intravenous iron administration to patients with CKD: impact of haptoglobin phenotype. *BMC Nephrol* 2015; **16**: 135.
- 117 Chen Y-C, Lee C-C, Huang C-Y, Huang H-B, Yu C-C, Ho Y-C *et al.* Haptoglobin polymorphism as a risk factor for chronic kidney disease: a case-control study. *Am J Nephrol* 2011; **33**: 510–514.
- 118 Nangaku M, Shankland SJ, Couser WG. Cellular response to injury in membranous nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 2005; **16**: 1195–1204.
- 119 Allison AC, Blumberg BS, Rees AP. Haptoglobin types in British, Spanish Basque and Nigerian African populations. *Nature* 1958; **181**: 824–825.
- 120 Awadallah S, Hamad M. A study of haptoglobin phenotypes in patients with chronic renal failure. *Ann Clin Biochem* 2003; **40**: 680–683.
- 121 Hamad M, Awadallah S. Age group-associated variations in the pattern of Hp type distribution in Jordanians. *Clin Chim Acta* 2000; **300**: 75–81.
- 122 Nakhoul FM, Zoabi R, Kanter Y, Zoabi M, Skorecki K, Hochberg I *et al.* Haptoglobin phenotype and diabetic nephropathy. *Diabetologia* 2001; **44**: 602–604.

REFERÊNCIAS

- 123 John A, Morich FJ. Identification of a so-far not characterized human serum protein associated with essential hypertension. *Electrophoresis* 1985; **6**: 292–295.
- 124 Costacou T, Secrest A, Ferrell RE, Orchard TJ. Haptoglobin genotype and cerebrovascular disease incidence in type 1 diabetes. *Diabetes Vasc Dis Res* 2014; **11**: 335–342.
- 125 Asleh R, Marsh S, Shilkrot M, Binah O, Guetta J, Lejbkowitz F *et al.* Genetically determined heterogeneity in hemoglobin scavenging and susceptibility to diabetic cardiovascular disease. *Circ Res* 2003; **92**: 1193–1200.
- 126 Orchard TJ, Sun W, Cleary P a., Genuth SM, Lachin JM, McGee P *et al.* Haptoglobin genotype and the rate of renal function decline in the diabetes control and complications trial/epidemiology of diabetes interventions and complications study. *Diabetes* 2013; **62**: 3218–3223.
- 127 Strandhave C, Svensson M, Krarup H, Christensen JH. Haptoglobin genotype and risk markers of cardiovascular disease in patients with chronic kidney disease. *Int J Nephrol* 2013; **2013**: 650847.
- 128 Santangelo F, Witko-Sarsat V, Drüeke T, Descamps-Latscha B. Restoring glutathione as therapeutic strategy in chronic kidney disease. *Nephrol Dial Transplant* 2004; **19**: 1951–1955.
- 129 Hayes JD, Flanagan JU, Jowsey IR. Glutathione transferases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2005; **45**: 51–88.
- 130 Simic T, Savic-Radojevic A, Pljesa-Ercegovac M, Matic M, Mimic-Oka J. Glutathione S-transferases in kidney and urinary bladder tumors. *Nat Rev Urol* 2009; **6**: 281–289.
- 131 Akimoto AK, Miranda-Vilela AL, Alves PCZ, Pereira LCDS, Lordelo GS, Hiragi CDO *et al.* Evaluation of gene polymorphisms in exercise-induced oxidative stress and damage. *Free Radic Res* 2010; **44**: 322–331.
- 132 Siddarth M, Datta SK, Mustafa MD, Ahmed RS, Banerjee BD, Kalra OP *et al.* Increased level of organochlorine pesticides in chronic kidney disease patients of unknown etiology: Role of GSTM1/GSTT1 polymorphism. *Chemosphere* 2014; **96**: 174–179.
- 133 Jain M, Kumar S, Rastogi N, Lal P, Ghoshal UC, Tiwari A *et al.* GSTT1, GSTM1 and GSTP1 genetic polymorphisms and interaction with tobacco, alcohol and occupational exposure in esophageal cancer patients from North India. *Cancer Lett* 2006; **242**: 60–67.
- 134 Sui Y, Han W, Yang Z, Jiang M, Li J. Association of glutathione S-transferase M1 and T1 null polymorphisms with the development of cervical lesions: A meta-analysis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2011; **159**: 443–448.
- 135 Burke MT, Isbel N, Barraclough KA, Jung J, Wells JW, Staatz CE. Pharmacogenomics Genetics and nonmelanoma skin cancer in. 2015; **16**: 161–172.

- 136 Saadat M, Dadbine-Pour A. Influence of polymorphism of glutathione S-transferase M1 on systolic blood pressure of normotensive individuals. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; **326**: 449–454.
- 137 Nomani H, Mozafari H, Ghobadloo SM, Rahimi Z, Raygani AV, Rahimi MA *et al.* The association between GSTT1, M1, and P1 polymorphisms with coronary artery disease in Western Iran. *Mol Cell Biochem* 2011; **354**: 181–187.
- 138 Taspinar M, Aydos S, Sakiragaoglu O, Duzen IV, Yalcinkaya A, Oztuna D *et al.* Genes on the Risk of Coronary Artery Disease. *DNA Cell Biol* 2012; **31**: 211–218.
- 139 Chang J, Ma JZ, Zeng Q, Cechova S, Gantz a., Nievergelt C *et al.* Loss of GSTM1, a NRF2 target, is associated with accelerated progression of hypertensive kidney disease in the African American Study of Kidney Disease (AASK). *AJP Ren Physiol* 2013; **304**: F348–F355.
- 140 Lin Y-S, Hung S-C, Wei Y-H, Tarng D-C. GST M1 polymorphism associates with DNA oxidative damage and mortality among hemodialysis patients. *J Am Soc Nephrol* 2009; **20**: 405–415.
- 141 Suvakov S, Damjanovic T, Pekmezovic T, Jakovljevic J, Savic-Radojevic a, Pljesa-Ercegovac M *et al.* Associations of GSTM1*0 and GSTA1*A genotypes with the risk of cardiovascular death among hemodialyses patients. *BMC Nephrol* 2014; **15**: 1–10.
- 142 Suvakov S, Damjanovic T, Stefanovic A, Pekmezovic T, Savic-Radojevic A, Pljesa-Ercegovac M *et al.* Glutathione S-transferase A1, M1, P1 and T1 null or low-activity genotypes are associated with enhanced oxidative damage among haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* 2013; **28**: 202–212.
- 143 Guitiérrez-Amavizca BE, Orozco-Castellanos R, Ortiz-Orozco R, Padilla-Gutiérrez J, Valle Y, Guitiérrez-Gutiérrez N *et al.* Contribution of GSTM1, GSTT1, and MTHFR polymorphisms to end-stage renal disease of unknown etiology in Mexicans. *Indian J Nephrol* 2013; **23**: 438–443.
- 144 Board P, Coggan M, Johnston P, Ross V, Suzuki T, Webb G. Genetic heterogeneity of the human glutathione transferases: a complex of gene families. *Pharmacol Ther* 1990; **48**: 357–369.
- 145 Wiencke JK, Pemble S, Ketterer B, Kelsey KT. Gene deletion of glutathione S-transferase theta: correlation with induced genetic damage and potential role in endogenous mutagenesis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1995; **4**: 253–259.
- 146 Raimondi S, Paracchini V, Autrup H, Barros-Dios JM, Benhamou S, Boffetta P *et al.* Meta- and pooled analysis of GSTT1 and lung cancer: A HuGE-GSEC review. *Am J Epidemiol* 2006; **164**: 1027–1042.
- 147 Agrawal S, Tripathi G, Khan F, Sharma R, Baburaj VP. Relationship between GSTs gene polymorphism and susceptibility to end stage renal disease among North Indians. *Ren Fail* 2007; **29**: 947–953.

REFERÊNCIAS

- 148 Westhoff TH, Scheid S, Tölle M, Kaynak B, Schmidt S, Zidek W *et al.* A physiogenomic approach to study the regulation of blood pressure. *Physiol Genomics* 2005; **23**: 46–53.
- 149 Datta SK, Kumar V, Pathak R, Tripathi AK, Ahmed RS, Kalra OP *et al.* Association of glutathione S-transferase M1 and T1 gene polymorphism with oxidative stress in diabetic and nondiabetic chronic kidney disease. *Ren Fail* 2010; **32**: 1189–1195.
- 150 Summers C, Hammons AL, Mitchell LE, Woodside J V, Yarnell JW, Young IS *et al.* Influence of cystathionine β -synthase 844ins68 and methylenetetrahydrofolate reductase 677C>T polymorphisms on folate and homocysteine concentrations. *Eur J Hum Genet* 2008; **16**: 1010–1013.
- 151 Goyette P, Sumner JS, Milos R, Duncan a. M, Rosenblatt DS, Matthews RG *et al.* Human methylenetetrahydrofolate reductase: isolation of cDNA, mapping and mutation identification. *Nat Genet* 1994; **7**: 195–200.
- 152 Yamada K, Strahler JR, Andrews PC, Matthews RG. Regulation of human methylenetetrahydrofolate reductase by phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; **102**: 10454–10459.
- 153 Biselli PM, Guerzoni AR, De Godoy MF, Eberlin MN, Haddad R, Carvalho VM *et al.* Genetic polymorphisms involved in folate metabolism and concentrations of methylmalonic acid and folate on plasma homocysteine and risk of coronary artery disease. *J Thromb Thrombolysis* 2010; **29**: 32–40.
- 154 Liew S-C, Gupta E Das. Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T polymorphism: Epidemiology, metabolism and the associated diseases. *Eur J Med Genet* 2015; **58**: 1–10.
- 155 Botto L, Yang Q. 5,10-Methylenetetrahydrofolate Reductase Gene Variants and Congenital Anomalies: A HuGE Review. *Am J Epidemiol* 2000; **151**.
- 156 Romero-Sánchez C, Gómez-Gutierrez A, Gómez PE, Casas-Gomez MC, Briceño I. C677t (rs1801133) MTHFR gen polymorphism frequency in colombian population. *Colomb Med* 2015; **46**: 75–79.
- 157 Kimura H, Gejyo F, Suzuki S, Miyazaki R. The C677T methylenetetrahydrofolate reductase gene mutation in hemodialysis patients. *J Am Soc Nephrol* 2000; **11**: 885–893.
- 158 Shiran A, Remer E, Asmer I, Karkabi B, Zittan E, Cassel A *et al.* Association of Vitamin B12 Deficiency with Homozygosity of the TT MTHFR C677T Genotype, Hyperhomocysteinemia, and Endothelial Cell Dysfunction. *Isr Med Assoc J* 2015; **17**.
- 159 Qian X, Lu Z, Tan M, Liu H, Lu D. A meta-analysis of association between C677T polymorphism in the methylenetetrahydrofolate reductase gene and hypertension. *Eur J Hum Genet* 2007; **15**: 1239–1245.
- 160 Holmes M V., Newcombe P, Hubacek J a., Sofat R, Ricketts SL, Cooper J *et al.* Effect modification by population dietary folate on the association between

- MTHFR genotype, homocysteine, and stroke risk: A meta-analysis of genetic studies and randomised trials. *Lancet* 2011; **378**: 584–594.
- 161 Ji Y, Kong X, Wang G, Hong X, Xu X, Chen Z *et al.* Distribution and Determinants of Plasma Homocysteine Levels in Rural Chinese Twins across the Lifespan. *Nutrients* 2014; **6**: 5900–5914.
 - 162 Cai W, Yin L, Yang F, Zhang L, Cheng J. Association between Hcy levels and the CBS844ins68 and MTHFR C677T polymorphisms with essential hypertension. *Biomed Reports* 2014; **2**: 861–868.
 - 163 Yang K, Jia J, Mao L, Men C, Tang K, Li Y *et al.* Methylenetetrahydrofolate reductase C677T gene polymorphism and essential hypertension: A meta-analysis of 10,415 subjects. *Biomed Reports* 2014; **2**: 699–708.
 - 164 Cortese C, Motti C. MTHFR gene polymorphism, homocysteine and cardiovascular disease. *Public Health Nutr* 2001; **4**: 493–497.
 - 165 Moczulski D, Fojcik H, Zukowska-Szczechowska E, Szydlowska I, Grzeszczak W. Effects of the C677T and A1298C polymorphisms of the MTHFR gene on the genetic predisposition for diabetic nephropathy. *Nephrol Dial Transplant* 2003; **18**: 1535–1540.
 - 166 Grossmann R, Schwender S, Geisen U, Schambeck C, Merati G, Walter U. CBS 844ins68, MTHFR TT677 and EPCR 4031ins23 genotypes in patients with deep-vein thrombosis. *Thromb Res* 2002; **107**: 13–15.
 - 167 Kumar J, Garg G, Karthikeyan G, Sengupta S. Cystathionine beta-synthase 844Ins68 polymorphism is not associated with the levels of homocysteine and cysteine in an Indian population. *Biomarkers* 2010; **15**: 283–287.
 - 168 Klerk M, Verhoef P, Clarke R, Blom HJ, Kok FJ, Schouten EG. MTHFR 677C → T Polymorphism and Risk of Coronary Heart Disease. *Am Med Assoc* 2002; **288**: 2023–2032.
 - 169 Janošíková B, Pavlíková M, Kocmanová D, Vítová A, Veselá K, Krupková L *et al.* Genetic variants of homocysteine metabolizing enzymes and the risk of coronary artery disease. *Mol Genet Metab* 2003; **79**: 167–175.
 - 170 Tylicki L, Födingner M, Puttinger H, Rutkowski P, Strozecki P, Tyszkowski S *et al.* Methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphisms in essential hypertension: Relation with the development of hypertensive end-stage renal disease. *Am J Hypertens* 2005; **18**: 1442–1448.
 - 171 Bloudícková S, Kuthanová L, Hubáček J a. MTHFR and HFE, but not preproghrelin and LBP, polymorphisms as risk factors for all-cause end-stage renal disease development. *Folia Biol (Czech Republic)* 2014; **60**: 83–88.
 - 172 Li W-X, Dai S-X, Zheng J-J, Liu J-Q, Huang J-F. Homocysteine Metabolism Gene Polymorphisms (MTHFR C677T, MTHFR A1298C, MTR A2756G and MTRR A66G) Jointly Elevate the Risk of Folate Deficiency. *Nutrients* 2015; **7**: 6670–6687.

- 173 Dong Q, Tang G, He M, Cai Y, Cai Y, Xing H *et al.* Methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism is associated with estimated glomerular filtration rate in hypertensive Chinese males. *BMC Med Genet* 2012; **13**: 74.
- 174 Yang S, Zhang J, Feng C, Huang G. MTHFR 677 T variant contributes to diabetic nephropathy risk in Caucasian individuals with type 2 diabetes: A meta-analysis. *Metabolism* 2013; **62**: 586–594.
- 175 Al-Rubeaan K, Siddiqui K, Saeb ATM, Nazir N, Al-Naqeb D, Al-Qasim S. ACE I/D and MTHFR C677T polymorphisms are significantly associated with type 2 diabetes in Arab ethnicity: A meta-analysis. *Gene* 2013; **520**: 166–177.
- 176 Zhang D, Zhou Y, Han L, Ji H, Li J. The effect of MTHFR C677T polymorphism on type 2 diabetes mellitus with vascular complications in Chinese Han population: A meta-analysis. *Endocr J* 2014; **61**: 717–726.
- 177 Böger CA, Stubanus M, Haak T, Götz AK, Christ J, Hoffmann U *et al.* Effect of MTHFR C677T genotype on survival in type 2 diabetes patients with end-stage diabetic nephropathy. *Nephrol Dial Transplant* 2007; **22**: 154–162.
- 178 Chen H, Wei F, Wang L, Wang Z, Meng J, Jia L *et al.* Original Article MTHFR gene C677T polymorphism and type 2 diabetic nephropathy in Asian populations : a meta-analysis. 2015; **8**: 3662–3670.
- 179 Miles EW, Kraus JP. Cystathionine β -synthase: Structure, function, regulation, and location of homocystinuria-causing mutations. *J Biol Chem* 2004; **279**: 29871–29874.
- 180 Casique L, Kabil O, Banerjee R, Martinez J, Lucca M De. Characterization of two pathogenic mutations in cystathionine beta-synthase: Different intracellular locations for wild-type and mutant proteins. *Gene* 2013; **531**: 1–19.
- 181 Meier M, Janosik M, Kery V, Kraus JP, Burkhard P. Structure of human cystathionine β -synthase: A unique pyridoxal 5-phosphate-dependent heme protein. *EMBO J* 2001; **20**: 3910–3916.
- 182 Kluijtmans LA, Boers GH, Trijbels FJ, van Lith-Zanders HM, van den Heuvel LP, Blom HJ. A common 844INS68 insertion variant in the cystathionine beta-synthase gene. *Biochem Mol Med* 1997; **62**: 23–25.
- 183 Tsai MY, Bignell M, Schwichtenberg K, Hanson NQ. High prevalence of a mutation in the cystathionine beta-synthase gene. *Am J Hum Genet* 1996; **59**: 1262–1267.
- 184 Franco RF, Elion J, Lavinha J, Krishnamoorthy R, Tavella MH, Zago MA. Heterogeneous Ethnic Distribution of the 844ins68 in the Cystathionine β -Synthase Gene. *Hum Hered* 1998; **48**: 338–342.
- 185 Janošíková B, Pavlíková M, Kocmanová D, Vítová A, Veselá K, Krupková L *et al.* Genetic variants of homocysteine metabolizing enzymes and the risk of coronary artery disease. *Mol Genet Metab* 2003; **79**: 167–175.

- 186 Dilley A, Hooper WC, El-Jamil M, Renshaw M, Wenger NK, Evatt BL. Mutations in the Genes Regulating Methylene. *Thromb Res* 2001; **103**: 109–115.
- 187 Tsai MY, Welge BG, Hanson NQ, Bignell MK, Vessey J, Schwichtenberg K *et al*. Genetic causes of mild hyperhomocysteinemia in patients with premature occlusive coronary artery diseases. *Atherosclerosis* 1999; **143**: 163–170.
- 188 Wang R. Physiological Implications of Hydrogen Sulfide: A Whiff Exploration That Blossomed. *Physiol Rev* 2012; **92**: 791–896.
- 189 Wang P, Isaak CK, Siow YL, O K. Downregulation of cystathionine γ -synthase and cystathionine γ -lyase expression stimulates inflammation in kidney ischemia-reperfusion injury. *Physiol Rep* 2014; **2**: e12251–e12251.
- 190 Kumar J, Das SK, Sharma P, Karthikeyan G, Ramakrishnan L, Sengupta S. Homocysteine levels are associated with MTHFR A1298C polymorphism in Indian population. *J Hum Genet* 2005; **50**: 655–663.
- 191 Kumar J, Garg G, Kumar A, Sundaramoorthy E, Sanapala KR, Ghosh S *et al*. Single nucleotide polymorphisms in homocysteine metabolism pathway genes: Association of CHDH A119C and MTHFR C677T with hyperhomocysteinemia. *Circ Cardiovasc Genet* 2009; **2**: 599–606.
- 192 Kumar J, Garg G, Sundaramoorthy E, Prasad PV, Karthikeyan G, Ramakrishnan L *et al*. Vitamin B12 deficiency is associated with coronary artery disease in an Indian population. *Clin Chem Lab Med* 2009; **47**: 334–338.
- 193 Brattström L, Lindgren a, Israelsson B, Andersson a, Hultberg B. Homocysteine and cysteine: determinants of plasma levels in middle-aged and elderly subjects. *J Intern Med* 1994; **236**: 633–641.
- 194 Cockcroft D, Gault H. Prediction of Creatinine Clearance from Serum Creatinine. *Nephron* 1976; **16**: 31–41.
- 195 Andrew S. Levey; Coresh; J, Balk; E, Kausz; AT, Levin; A, Steffes; MW *et al*. Clinical Guidelines National Kidney Foundation Practice Guidelines for Chronic Kidney. *Ann Intern Med* 2003; **139**: 137–147.
- 196 Wilson P. Polycystic kidney disease. *N Engl J Med* 2001; **350**: 151–164.
- 197 Ravine D, Gibson RN, Donlan J, Sheffield LJ. An Ultrasound Renal Cyst Prevalence Survey: Specificity Data for Inherited Renal Cystic Diseases. *Am J Kidney Dis* 1993; **22**: 803–807.
- 198 Lahiri DK, Nurnberger JI. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Res* 1991; **19**: 5444.
- 199 Marques F, Crespo ME, Silva ZI, Bicho M. Redox modulation of reductase and phosphatase activities in human erythrocytes. *Protoplasma* 1999; **206**: 168–173.
- 200 Board PG, Pidcock ME. Methaemoglobinaemia resulting from heterozygosity for two NADH-methaemoglobin reductase variants: characterization as NADH-ferricyanide reductase. *Br J Haematol* 1981; **47**: 361–370.

REFERÊNCIAS

- 201 Marques F, Crespo ME, Pantaleao O, Bicho M. Insulin activation of NADH ferricyanide reductase in human erythrocytes is mediated by the insulin receptor tyrosine kinase: a comparative study in normal and diabetic states. *Redox Rep* 1996; **2**: 373–378.
- 202 Linke RP. Typing and subtyping of haptoglobin from native serum using disc gel electrophoresis in alkaline buffer: Application to routine screening. *Anal Biochem* 1984; **141**: 55–61.
- 203 Griffioen PH, De Jonge R, Van Zelst BD, Brouns RM, Lindemans J. Detection and allele-frequencies of the 833T>C, 844ins68 and a novel mutation in the cystathionine β -synthase gene. *Clin Chim Acta* 2005; **354**: 191–194.
- 204 Rollinson S, Roddam P, Kane E, Roman E, Cartwright R, Jack A *et al.* Polymorphic variation within the glutathione S-transferase genes and risk of adult acute leukaemia GST T1, GST M1 and GST P1 affect the body's ability to. *Carcinogenesis* 2000; **21**: 43–47.
- 205 Pearson WR, Vorachek WR, Xu SJ, Berger R, Hart I, Vannais D *et al.* Identification of class-mu glutathione transferase genes GSTM1-GSTM5 on human chromosome 1p13. *Am J Hum Genet* 1993; **53**: 220–233.
- 206 Konrad C, Müller GA, Langer C, Kuhlenbäumer G, Berger K, Nabavi DG *et al.* Plasma homocysteine, MTHFR C677T, CBS 844ins68bp, and MTHFD1 G1958A polymorphisms in spontaneous cervical artery dissections. *J Neurol* 2004; **251**: 1242–1248.
- 207 Marinho C, Alho I, Oliveira J, Rego C, Guerra A, Bicho M. ARTIGO ORIGINAL A sobrecarga oxidante como factor de risco associado à obesidade: relação com o glutatono plasmático e com o fenótipo da haptoglobina. 2008; : 57–61.
- 208 Hishida A, Okada R, Guang Y, Naito M, Wakai K, Hosono S *et al.* MTHFR, MTR and MTRR polymorphisms and risk of chronic kidney disease in Japanese: Cross-sectional data from the J-MICC Study. *Int Urol Nephrol* 2013; **45**: 1613–1620.
- 209 Lois K, Kumar S. Obesity and diabetes. *Endocrinol Nutr* 2009; **56**: 38–42.
- 210 Łukaszyk E, Łukaszyk M, Koc-Żórawska E, Tobolczyk J, Bodzenta-Łukaszyk A, Małyszko J. Iron Status and Inflammation in Early Stages of Chronic Kidney Disease. *Kidney Blood Press Res* 2015; **40**: 366–373.
- 211 Costa E, Swinkels DW, Laarakkers CM, Rocha-Pereira P, Rocha S, Reis F *et al.* Hepcidin serum levels and resistance to recombinant human erythropoietin therapy in haemodialysis patients. *Acta Haematol* 2009; **122**: 226–229.
- 212 De Almeida E, Alho I, Marques F, Thiran C, Bicho M, Prata M. Haemoglobin and erythropoietin levels in polycystic kidney disease. *Nephrol Dial Transplant* 2008; **23**: 413–414.
- 213 Costa-Mallen P, Zabetian CP, Agarwal P, Hu S-C, Yearout D, Samii A *et al.* Haptoglobin phenotype modifies serum iron levels and the effect of smoking on Parkinson disease risk. *Parkinsonism Relat Disord* 2015; **21**: 1087–1092.

- 214 Silva A, Neves J, Bicho MC, Carvalho R, Lopes C, Clara JPG *et al.* Atividade de Duas Enzimas Associadas à Apoptose e Envelhecimento Celular na Hipertensão Arterial [16]. *Rev Port Cardiol orgao Of da Soc Port Cardiol* 2006; : 189–195.
- 215 Ijäs P, Saksi J, Soinne L, Tuimala J, Jauhiainen M, Jula A *et al.* Haptoglobin 2 allele associates with unstable carotid plaque and major cardiovascular events. *Atherosclerosis* 2013; **230**: 228–234.
- 216 Leclerc JL, Blackburn S, Neal D, Mendez N V., Wharton J a., Waters MF *et al.* Haptoglobin phenotype predicts the development of focal and global cerebral vasospasm and may influence outcomes after aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Proc Natl Acad Sci* 2015; **112**: 1155–1160.
- 217 Costacou T, Ferrell R, Ellis D, Orchard T. Haptoglobin genotype and renal function decline in type 1 diabetes. *Diabetes* 2009; **58**: 2904–09.
- 218 Bicho M, Silva A Da, Medeiros R, Bicho M. The Role of Haptoglobin and Its Genetic Polymorphism in Cancer: A Review. *Intech* 2013; 55–76.
- 219 Nasri H. Renal Cell Protection of Erythropoietin beyond Correcting The Anemia in Chronic Kidney Disease Patients. *Cell J* 2014; **15**: 378–80.
- 220 Cançado RD, Chiattoni CS. Anemia de Doença Crônica Definição e Terminologia Patogênese. 2002; **24**: 127–136.
- 221 Mogadam RA, Ghorbanihaghjo A, Argani H, Nemati A, Amani F, Bashardoust B. Association between hepcidin , haemoglobin level and iron status in stage 4 chronic kidney disease patients with anaemia. 2015; **65**: 354–357.
- 222 Abensur H. Deficiência de ferro na doença renal crônica. *Rev Bras Hematol Hemoter* 2010; **32**: 95–98.
- 223 Van Vlierberghe H, Langlois M, Delanghe J. Haptoglobin polymorphisms and iron homeostasis in health and in disease. *Clin Chim Acta* 2004; **345**: 35–42.
- 224 Maffei M, Funicello M, Vottari T, Gamucci O, Costa M, Lisi S *et al.* The obesity and inflammatory marker haptoglobin attracts monocytes via interaction with chemokine (C-C motif) receptor 2 (CCR2). *BMC Biol* 2009; **7**: 87.
- 225 Carter K, Worwood M. Haptoglobin: A review of the major allele frequencies worldwide and their association with diseases. *Int J Lab Hematol* 2007; **29**: 92–110.
- 226 Miller-Lotan R, Herskowitz Y, Kalet-Litman S, Nakhoul F, Aronson D, Zoabi R *et al.* Increased renal hypertrophy in diabetic mice genetically modified at the haptoglobin locus. *Diabetes Metab Res Rev* 2005; **21**: 332–7.
- 227 Symeonidis A, Kouraklis-Symeonidis A, Psiroyiannis A, Leotsinidis M, Kyriazopoulou V, Vassilakos P *et al.* Inappropriately low erythropoietin response for the degree of anemia in patients with noninsulin-dependent diabetes mellitus. *Ann Hematol* 2006; **85**: 79–85.

REFERÊNCIAS

- 228 Craig KJ, Williams JD, Riley SG, Smith H, Owens DR, Worthing D *et al.* Anemia and diabetes in the absence of nephropathy. *Diabetes Care* 2005; **28**: 1118–1123.
- 229 Marques F, Crespo ME, Silva ZI, Bicho M. Insulin and high glucose modulation of phosphatase and reductase enzymes in the human erythrocytes: A comparative analysis in normal and diabetic states. *Diabetes Res Clin Pract* 2000; **47**: 191–198.
- 230 Bessa SS, Ali EMM, Hamdy SM. The role of glutathione S- transferase M1 and T1 gene polymorphisms and oxidative stress-related parameters in Egyptian patients with essential hypertension. *Eur J Intern Med* 2009; **20**: 625–630.
- 231 Zweier JL, Chen C-A, Druhan LJ. S-Glutathionylation Reshapes Our Understanding of Endothelial Nitric Oxide Synthase Uncoupling and Nitric Oxide/Reactive Oxygen Species-Mediated Signaling. *Antioxid Redox Signal* 2011; **14**: 1769–1775.
- 232 Apelt N, da Silva AP, Ferreira J, Alho I, Monteiro C, Marinho C *et al.* ACP1 genotype, glutathione reductase activity, and riboflavin uptake affect cardiovascular risk in the obese. *Metabolism* 2009; **58**: 1415–23.
- 233 Barbieri L, Verdoia M, Schaffer a., Niccoli G, Perrone-Filardi P, Bellomo G *et al.* Elevated Homocysteine and the Risk of Contrast-Induced Nephropathy: A Cohort Study. *Angiology* 2015; **66**: 333–338.
- 234 Anwar W, Guéant JL, Abdelmouttaleb I, Adjalla C, Gérard P, Lemoel G *et al.* Hyperhomocysteinemia is related to residual glomerular filtration and folate, but not to methylenetetrahydrofolate-reductase and methionine synthase polymorphisms, in supplemented end-stage renal disease patients undergoing hemodialysis. *Clin Chem Lab Med* 2001; **39**: 747–752.
- 235 Qin X, Li Y, Yuan H, Xie D, Tang G, Wang B *et al.* Relationship of MTHFR Gene 677C->T Polymorphism, Homocysteine, and Estimated Glomerular Filtration Rate Levels With the Risk of New-Onset Diabetes. *Med* 2015; **94**: e563.
- 236 Domenici FA, Vannucchi MTI, Simões-Ambrósio LMC, Vannucchi H. Hyperhomocysteinemia and polymorphisms of the methylenetetrahydrofolate gene in hemodialysis and peritoneal dialysis patients. *Mol Nutr Food Res* 2007; **51**: 1430–1436.
- 237 Nazki FH, Sameer AS, Ganaie BA. Folate: Metabolism, genes, polymorphisms and the associated diseases. *Gene* 2014; **533**: 11–20.
- 238 Levi A, Cohen E, Levi M, Goldberg E, Garty M, Krause I. Elevated serum homocysteine is a predictor of accelerated decline in renal function and chronic kidney disease: A historical prospective study. *Eur J Intern Med* 2014; **25**: 951–955.
- 239 Bagley PJ, Selhub J. A common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene is associated with an accumulation of formylated tetrahydrofolates in red blood cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; **95**: 13217–20.

- 240 Comings DE, MacMurray JP. Molecular Heterosis: A Review. *Mol Genet Metab* 2000; **71**: 19–31.

ANEXOS

ANEXOS

Anexos 1- Consentimento informado



HOSPITAL DE SANTA MARIA SERVIÇO DE NEFROLOGIA

Prof. M Martins Prata - Director do Serviço

TERMO DE CONSENTIMENTO

Eu, _____ abaixo-assinado,
após ter sido adequadamente informado, autorizo a utilização dos meus
dados pessoais (identificação, dados demográficos, características clínicas
e resultados analíticos), para o Projecto de Investigação sobre a Doença
Poliquística Renal Autossómica Dominante, da autoria do Dr. Edgar Almeida
e colaboradores, cujo responsável é o Prof. Dr. M Martins Prata, Director
do Serviço de Nefrologia do Hospital de Santa Maria, em Lisboa.

Assinatura _____

Data _____

Anexos 2- Tabelas suplementares

Tabela suplementar 1: Primers utilizados para a amplificação dos fragmentos de interesse das variantes genéticas estudadas.

Polimorfismo	Sequência dos primers
<i>MTHFR</i>	Forward: 5' - TGA AGG AGA AGG TGT CTG CGG GA - 3' Reverse: 5' - AGG ACG GTG CGG TGA GAG TG -3'
<i>CβS</i>	Forward: 5' – GCA GTT GTT AAC GGC GGT ATT G - 3' Reverse: 5' – GCC GGG CTC TGG ACT CGA CCT A – 3'
<i>GSTT1/M1</i>	P1: 5' - GCC ATC TTG TGC TAC ATT GCC G -3' GSTM1/M4 P2: 5' – ATC TTC TCC TCT TCT GTC TCC CC – 3' GSTM1/M4 P3: 5' – TTC TGG ATT GTA GCA GAT CAT CAT GCC C -3' GSTM1 P4: 5' – TTC CTT ACT GGT CCT CAC ATC TC -3' GSTT1 P5: 5'- TCA CCG GAT CAT GGC CAG CA – 3' GSTT1

Tabela suplementar 2: Condições de amplificação.

Polimorfismos	Condições de PCR	Componentes
<i>MTHFR</i>	30 ciclos Desnaturação: 30s a 94°C Emparelhamento: 1 min a 61°C Extensão: 1 min a 72°C Extensão final: 7 min a 72°C	ADN: 10µL, 200ng Primer F: 1µL, 10pmol Primer R: 1µL, 10pmol DreamTaq Green PCR Master Mix (2x) DreamTaq Green buffer, 0.4 Mm de PCR nucleotide mix e 4mM de MgCl ₂): 12.5µL DMSO: 1.25µL, 5%
<i>CβS</i>	40 ciclos Desnaturação: 30s a 94°C Emparelhamento: 30s a 62.5°C Extensão: 40s a 72°C Extensão final: 10 min a 72°C	ADN: 10µL, 200ng Primer F: 1µL, 10pmol Primer R: 1µL, 10pmol DreamTaq Green PCR Master Mix (2x) DreamTaq Green buffer, 0.4 Mm de PCR nucleotide mix e 4mM de MgCl ₂): 12.5µL H ₂ O: 7.5µL
<i>GSTT1/M1</i>	40 ciclos Desnaturação: 45s a 95°C Emparelhamento: 45s a 58°C Extensão: 45s a 72°C Extensão final: 5 min a 72°C	ADN: 10µL, 200ng Primer 1 a 5: 1µL, 20pmol DreamTaq Green PCR Master Mix (2x) DreamTaq Green buffer, 0.4 Mm de PCR nucleotide mix e 4mM de MgCl ₂): 25µL DMSO: 2.5µL, 5% H ₂ O: 7.5µL

Tabela suplementar 3: Resumo das condições utilizadas na electroforese para determinação dos genótipos das variantes genéticas analisadas.

Polimorfismos	Eletroforese	Genótipos (pb)
<i>MTHFR</i>	3%, 100 volts, 90 min	CC (198)
		CT (198, 175, 23)
		TT (175, 23)
<i>CβS</i>	3%, 100 volts, 90 min	Del/del (252)
		Ins/del (320 + 252)
		Ins/ins (320)
GSTT1M1	3%, 100 volts, 60 min	Não nulo para GSTT1 (480)
		Não nulo para GSTM1 (230)
		Não nulo para GSTM4 - padrão interno (157)

%, de agarose; pb, pares de bases

Anexos 3- Visualização dos genótipos após electroforese

Figura Suplementar 1: Gel de amplificação dos polimorfismos GSTT1/M1. O fragmento de 157 pb correspondente à GST M4, usado como controle interno de amplificação. A presença de fragmentos de 230 e 480 pb indica GST M1 e GST T1 genótipos não nulos, respectivamente. M, Marcador de peso molecular (Mass Ruler, DNA Ladder Low range, Fermentas); 1, 2, 3, 5 e 6- GST M1/T1 genótipo nulo; 3, 9 e 10- GST M1/T1 genótipo não nulo; 4, 7 e 8- GSTM1 nulo/GSTT1 genótipo não nulo.

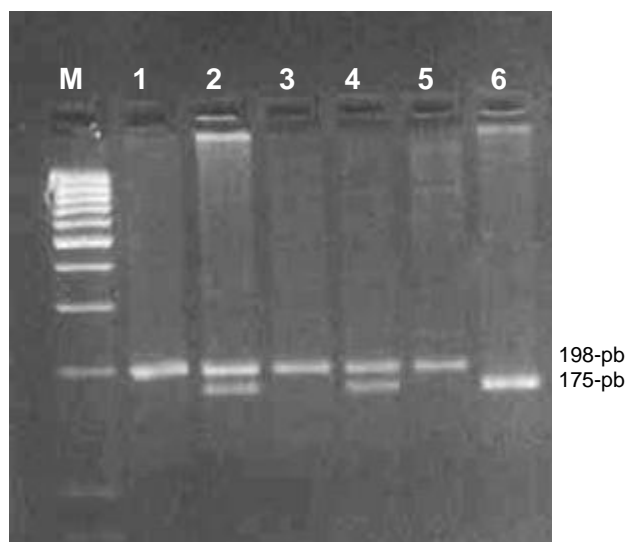


Figura Suplementar 2: Gel de amplificação do polimorfismo do PCR-RFLP de genótipo *MTHFR*. O fragmento de 198 pb revela o produto de PCR não digerida do alelo C. O 175 pb corresponde à digestão alelo T com HinfI. M Marcador de peso molecular (Mass Ruler, DNA Ladder Low range, Fermentas); 1, 3 e 5 – homozigotos CC; 2 e 4- heterozigotos CT; pistas 6- homozigoto TT.

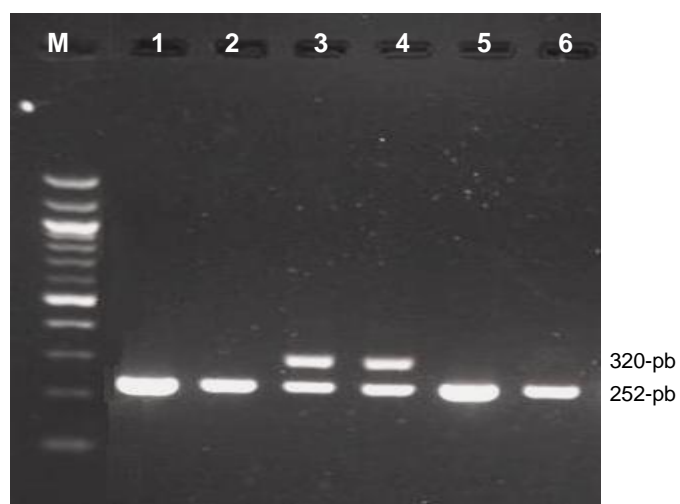


Figura Suplementar 3: Gel de amplificação do polimorfismo da C β S. O fragmento de 198 pb revela o produto de PCR não digerida do alelo C. O fragmento de 320 pb corresponde ao genótipo de inserção do gene da C β S. M, Marcador de peso molecular (Mass Ruler, DNA Ladder Low range, Fermentas); 1, 2, 5 e 6 – homozigótico para a deleção; 3 e 4 - heterozigotos deleção/inserção; Não presente na imagem- homozigótico para a inserção.